

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Diplomová práce

Farmakognostická studie *Alnus spp.*

(Pharmacognostic study of *Alnus spp.*)

Hradec Králové 2007

Jakub Chlebek

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce prof. L. Jahodářovi za všestrannou pomoc, odborné vedení, neocenitelné rady a trpělivost, stejně tak i ostatním členům katedry za velice přátelské prostředí. Ing. J. Pirnerovi a jeho zaměstnankyním Botanické zahrady léčivých rostlin při Farmaceutické fakultě a PharmDr. T. Siatkovi za pomoc při zpracování kořenů olše. Ing. P. Chlebkovi za pomoc při získávání kořenů a botanické určení druhu *Alnus glutinosa*.

Obsah

1.	ÚVOD	5
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1	Botanická charakteristika	6
2.1.1	Botanické zařazení	6
2.1.2	Charakteristika rodu <i>Alnus</i>	6
2.1.3	Charakteristika druhu	7
2.2	Charakteristika obsahových látek rodu a druhu	11
2.2.1	Třísloviny	11
2.2.2	Triterpeny a steroidy	20
2.2.3	Diarylheptanoidy	28
2.2.4	Látky odvozené od fenypropanu	36
2.2.5	Deriváty kyseliny benzoové a hexahydroxydifenové	37
2.2.6	Flavonoidy.....	39
2.2.7	Derivát adeninu	47
2.2.8	Xanthony	47
2.2.9	Fenanthren.....	48
2.2.10	Derivát stilbenu	48
2.2.11	Aminokyseliny	48
2.2.12	Monosacharidy	49
2.2.13	Chinony	50
2.2.14	Vyšší alifatické uhlovodíky, alkoholy a kyseliny	50
2.2.15	Prekurzor aromatických látek.....	51
2.2.16	Vitamíny.....	51
2.2.17	Ostatní	52
2.3	Biologická aktivita	53
2.3.1	Přehled biologické aktivity látek rodu <i>Alnus</i>	53
3.	CÍL PRÁCE.....	67
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	68
4.1	Charakteristika zpracovaného materiálu	68
4.2	Použité chemikálie	68
4.3	Použité chromatografické adsorbenty	69
4.4	Použité přístroje.....	69

4.5	Testovací silikagelová kolona	70
4.5.1	Úvodní chromatografické hodnocení komplexního extraktu pomocí TLC	70
4.6	Dělení na silikagelové koloně	85
4.6.1	Vyhodnocení jednotlivých frakcí	91
4.7	Etherová frakce komplexního extraktu	107
4.7.1	TLC	107
4.7.2	HPLC.....	111
4.7.3	Antioxidační aktivita etherové frakce	113
5.	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE.....	119
6.	SOUHRN	122
7.	LITERATURA.....	123

1. ÚVOD

Rostliny jsou zdrojem celé řady biologicky aktivních látek, v současné době nacházejí své uplatnění nejen při léčbě lehčích, ale i závažných nemocí - např. jako antineoplastika (taxol, vinkristin,...). Obsahové látky rostlin, vykazující hledanou biologickou aktivitu, mohou být předlohou pro organické syntézy - je to jedna z dalších možností získávání nových a účinných léčiv. Rostlinné biologicky aktivní substance tedy stále mají co nabídnout i do budoucnosti.

Teoretická část diplomové práce je rozčleněna na tři tématické celky. V první části se nachází taxonomické zařazení tří domácích zástupců rodu *Alnus* (*Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Alnus rugosa*), jejich botanická charakteristika, ekologie, význam.

Cílem druhé a třetí části bylo zmapování obsahových a biologických aktivit látek obsažených v rodu *Alnus*.

Praktická část je zaměřena na fytochemickou studii a biologickou aktivitu kořene olše lepkavé (radix *Alnus glutinosa*). Olše lepkavá byla vybrána jako hojně rostoucí a lehce dostupný domácí zástupce rodu *Alnus* patřící do čeledi Betulaceae, ve které se vyskytují velice zajímavé látky. V poslední době byly často publikovány práce o izolaci a biologické aktivitě diarylheptanoidů (výskyt těchto látek byl potvrzen taky u jiných čeledích např. Zingiberaceae). Z hlediska fytochemického výzkumu a biologických aktivit patří kořeny olše k méně probádaným orgánům rostliny. Dosud nebyly publikovány práce o výskytu výše zmiňovaných diarylheptanoidů, které byly dříve prokázány v kůře, dřevu, listech, květech a plodech olší. Výskyt diarylheptanoidu oregoninu v kůře *Alnus glutinosa* naznačuje, že by mohl být prokázán výskyt oregoninu i v kořenech a tato problematika se stala náplní mé diplomové práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Botanická charakteristika ⁽¹⁾

2.1.1 Botanické zařazení

Říše: rostliny (Plantae)

Podříše: cévnaté rostliny (Tracheobionta)

Oddělení: krytosemenné (Magnoliophyta)

Třída: vyšší dvouděložné (Magnoliopsida)

Řád: břízotvaré (Betulales)

Čeleď: břízovité (Betulaceae)

Rod: olše (Alnus)

Druh: u nás se vyskytují: olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), olše šedá (*Alnus incana*), olše svraskalá (*Alnus rugosa*)

2.1.2 Charakteristika rodu *Alnus*

Jednodomé stromy nebo keře. Kořeny srdcovité, s šikmými postranními kořeny s korálkovitými nádory. Korálkovité nádory na postranních kořenech olší vyvolává symbiotický aktinomycet rodu *Frankia*, který má schopnost poutat vzdušný dusík a obohacovat jím půdu. Pupeny stopkaté, tupé, se 2 stejnými šupinami. Jehnědy se rozvíjejí před vyrašením listů. Samčí přezimují, válcovité, stopkaté; květy jednopohlavné v trojvětých vidlanech za podpůrným listenem, prostřední květ se 2, postranní každý s 1 listencem, okvěti (3-) 4 (-6) četné, srostlé; tyčinky 4 (-6), epitepalní, prašníky v horní části rozštěpené, lysé. Samičí jehnědy vejcovité, přisedlé nebo na tlustých stopkách, květy po 2 za podpůrným listenem v neopadavou, za plodu dřevnatějící podpůrnou šupinu; blizny 2, nitkovité. Plod

nažka s kožovitým, neprůsvitným lemem. Asi 25 druhů, většinou v mírném pásmu severní polokoule; některé v horách Střední a Jižní Ameriky.

2.1.3 Charakteristika druhu

Alnus glutinosa (L.) Gaertn. – olše lepkavá

(synonyma : *Betula alnus* (L). var. *glutinosa*, *Betula glutinosa*(L.), *Alnus vulgaris*)

Keř nebo strom (často vícekmenný), až 20 (-35) m vysoký. Koruna řídká, podlouhle vejcovitá až jehlancovitá. Letorosty lysé nebo roztroušeně pýřité, lepkavé; borka v mládí tmavošedá, později šedá až černohnědá, rozbrázděná, šupinatá nebo destičková. Pupeny stopkaté, obvejcovité, tupé nebo tupě špičaté, červenohnědé, lysé, lepkavé. Čepel listů ± okrouhlá nebo obkrouhle obvejčitá, 4-9 cm dlouhá, a 3-7 cm široká, nepravidelně dvojité pilovitá, na špičce tupá nebo vykrojená, na bázi klínovitě zúžená, v mládí lepkavá, na rubu alespoň v úžlabí žilek nažloutle chlupatá, postranních žilek 5-8 párů; řapík 1-2 cm dlouhý. Listy na podzim nežloutnou, ale opadávají zelené. Samčí jehnědy po 2-5 na koncích větví, 4-7 cm dlouhé; okvěti (3-) 4 (-6) čtené, někdy zakrnělé; tyčinky 4, prašníky žluté. Samičí jehnědy po 3-4 (5), 5-10 cm dlouhé; široce vejcovité, přímé; blizny červené; plodní šišťice vejcovité až elipsoidní, 0,8-1,2 cm dlouhé, stopkaté; podpurná šupina štítkovitě zduřelá, vpředu nepravidelně vroubkovaná. Nažky ploché, černohnědé, lesklé, s úzkým lemem; dozrávají v září, ze šištic se uvolňují postupně během podzimu a zimy (až do konce února). Plodit začíná asi ve 12 letech, poté každoročně, hojněji každým druhým nebo třetím rokem. Dožívá se až 100 let.

Ekologie

Lužní lesy, bažiny, prameniště, břehy tekoucích i stojatých vod. Na nevápenných, hlinitých nebo jílovitých, vlhkých až zbahnělých, často zaplavovaných půdách. Na světlo je méně náročná než *A. incana*.

Rozšíření v ČR

Roztroušeně až hojně v celém území, kromě vyšších poloh a nejsušších oblastí; nejhojněji v nížinných luzích. Běžně se vysazuje.

Význam

Zlepšuje půdu, a proto ji lze použít jako přípravné dřeviny při zalesňování neplodných ploch, starých holin nebo degradovaných lesních půd. Snáší silně znečištěné ovzduší. Vysazuje se také na břehů vodních toků. Dřevo je žluté až oranžové, za sucha načervenalé, lehké, dobře štípatelné, málo pružné, odolné proti vodě. Nachází použití v soustružnictví a při výrobě překližek, rámu, lišt a zápalek. Druh se často vysazuje i v parcích, někdy v okrasných kultivarech.

***Alnus incana* (L.) MOENCH** – olše šedá

(synonymum: *Betula alnus* (L.) var. *incana*)

Strom nebo keř 6-20 m vysoký, s přímým, štíhlým kmenem a vejcovitou, hustou korunou. Letorosty pýřité, olýsávající, nelepivé. Borka světle šedohnědá, s nezřetelnými lenticelami, i ve stáří hladká. Pupeny stopkaté, tupě špičaté, plstnaté, nelepivé. Čepel listů vejčitá, 4-10 (-12) cm dlouhá, 3-7 (-9) cm široká, dvojité pilovitá až mělce laločnatá, špičatá nebo zašpičatělá, na bázi uťatá až slabě srdčitá, nelepivá, na rubu šedě chlupatá až plstnatá, později kromě žilek ± olýsávající, s 8-12 páry žilek; řapík 1,5-2,5 cm dlouhý. Samčí jehnědy po 3-5 koncích větévek, 7-9 cm dlouhé; okvěti 4 (-6) četné, tyčinky 4 (-6), prašníky žluté. Samičí jehnědy po 4-8; plodní šištice vejcovité, 10-16 mm dlouhé, přisedlé nebo nejdolejší kratičce stopkaté. Nažky ploché, rezavě hnědé, s úzkým lemlem. Kvete o 1-2 týdny dříve než *A. glutinosa*, nažky dozrávají v září až říjnu, z šištice vypadávají až do prosince. Plodnost začíná velmi časně, někdy už v 6 letech a je časná. Dožívá se maximálně 50 let.

Ekologie

Břehy horských řek, potoků, balvanité náplavy; také na hlinitých, jen občas zaplavovaných půdách. Vyžaduje dobře provzdušněný substrát, nesnáší stagnující vodu. Rychle rostoucí mrazuvzdorná dřevina náročná na světlo, málo odolná v konkurenci jiných druhů dřevin.

Rozšíření v ČR

Hojně ve všech horských a podhorských oblastech, (max. 1000 m). Podél vodních toků sestupuje hluboko do nižších poloh, kde však je častější sázená.

Význam

Používá se jako přípravná a meliorační dřevina v mrazových polohách a na neplodných půdách, při zpevňování sesuvných svahů nebo jako dřevina krycí a výchovná. Je vhodná k zalesňování extrémních stanovišť. Dřevo je velmi lehké, měkké, málo trvanlivé. V zahradách se pěstuje v několika kultivarech.

Alnus rugosa (Ehrh.) SPRENG. - olše svraskalá

(synonymum: *Betula alnus* (L.) var. *rugosa*)

Keř 2-4 m vysoký, řidčeji nízký strom. Čepel listů vejčitá až široce eliptická, 6-10 cm dlouhá a 4-7 cm široká, nepravidelně dvojité pilovitá až mělce laločnatá, ± špičatá, na bázi zaokrouhlená až mělce srdčitá, na rubu alespoň na žilkách rezavě chlupatá; postranních žilek 10-12 párů. Samičí jehnědy v době květu vzpřímené. Plodní šištice 10-15 mm dlouhé, horní přisedlé, dolní stopkaté. Nažky s širokým lemem. Pěstována jako okrasný keř a místy v lesích zplaňující. Do Evropy introdukována, původní ve východní části Severní Ameriky.

Rozlišovací znaky k určení jednotlivých domácích druhů

A. rugosa

Letorosty rezavě plstnaté; listy na rubu s červenohnědými chlupy v úžlabí žilek.

A. glutinosa

Letorosty šedé nebo nažloutle pýřité; listy na rubu lysé nebo se šedými, popř. nažloutlými chlupy. Listy okrouhle obvejčité až okrouhlé, tupé nebo vykrojené, v mládí lepkavé, s 5-8 páry postranních žilek; plodní šištice vesměs stopkaté.

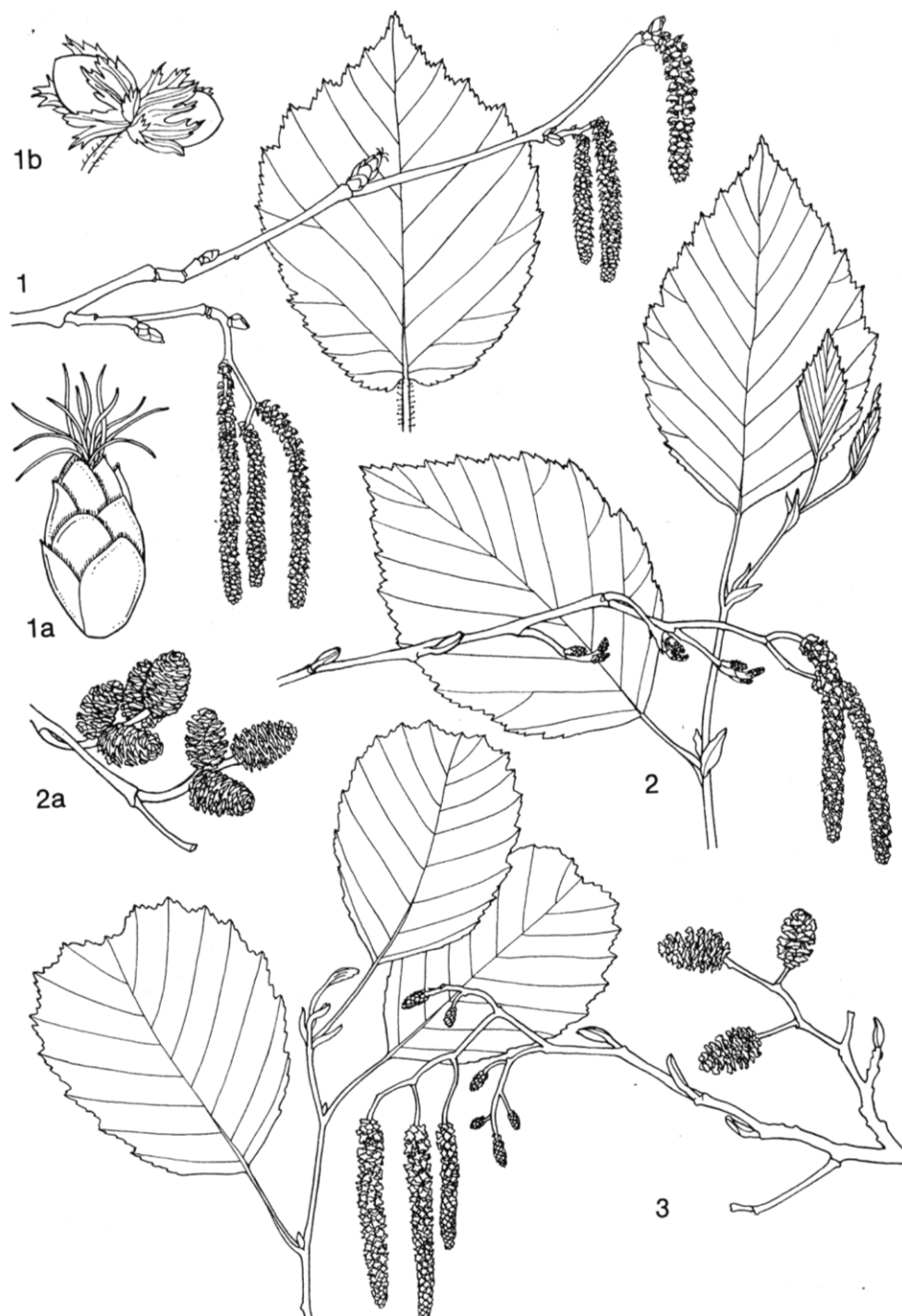
A. incana

Letorosty šedé nebo nažloutle pýřité; listy na rubu lysé nebo se šedými, popř. nažloutlými chlupy.

Listy vejčité eliptické, špičaté, nelepkavé, s 8-12 páry postranních žilek; plodní šištice přisedlé nebo nejdolejší kratičce stopkaté.

Obr. 1

1 *Corylus avellana*, 2 *Alnus incana*, 3 *Alnus glutinosa*

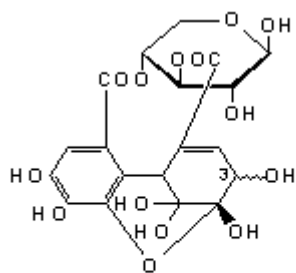


2.2 Charakteristika obsahových látek rodu a druhu

Intenzivnímu fytochemickému studiu diarylheptanoidů byly s výjimkou kořenů podrobeny všechny orgány rodu *Alnus*. O problematice obsahových látek diarylheptanoidů v kořenech nebyly dosud publikovány žádné práce.

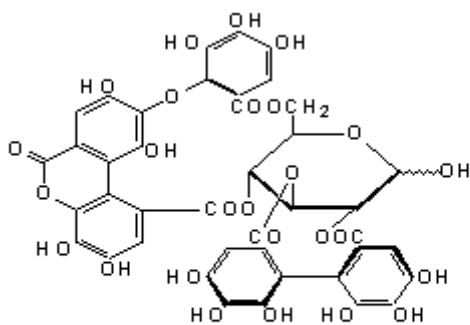
2.2.1 Třísloviny

Alnicortol (2,6-methano-2H-1-benzoxocin- β -D-xylopyranosa)



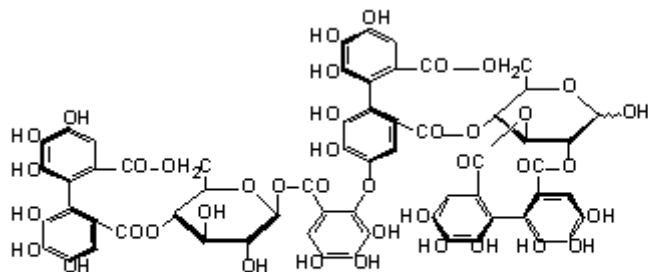
Alnicortol a Alnicortin (3-oxo derivát) se nacházejí v kůře *A. incana*, *A. glutinosa*, *A. sibirica*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. rubra* ^(2, 3)

Alnusiin (β -D-glukosa derivát 17,19-Etheno-5H,7H-[1]benzopyrano[4,5-de][1,8,12]benzotrioxacyclopentadecinu)



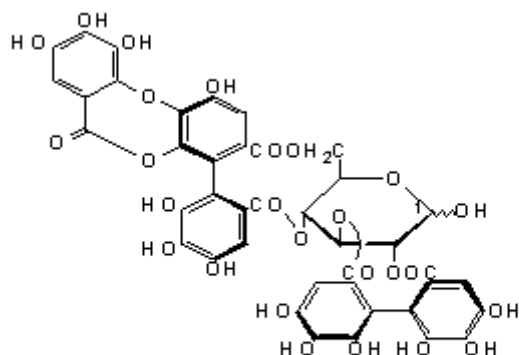
Sloučenina izolována z *A. sieboldiana* ⁽⁴⁾

Alnusjaponin B (D-Glukosa, cyklo 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat] cyklo 4->2:6->2'-[(1S)-4-[6-[[[4,6-O-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-diyl]dikarbonyl]-β-D-glukopyranosyl]oxy]karbonyl]-2,3,4-trihydroxyfenoxy]-4',5,5',6,6'-pentahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat])



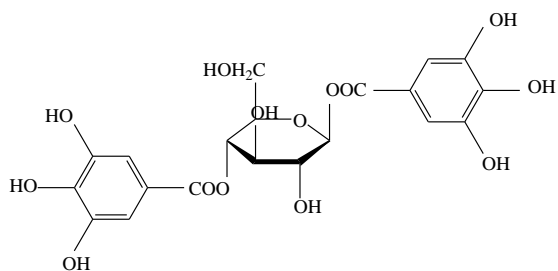
Sloučenina izolována z listu *A. japonica* ⁽⁵⁾

Alnusnin B (D-Glukosa, cyklo 4->2':6->2'-[(1S)-5-(6-karboxy-2,3,4-trihydroxyfenoxy)-4,4',5',6,6'-pentahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat] 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat])



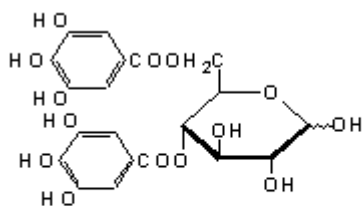
Alnusnin B a Alnusnin A (1-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)derivát Alnusninu B) byly izolovány z listů *A. sieboldiana* ⁽⁶⁾

1,4-di-O-galloyl-β-D-glukosa (1,4-di-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-β-D-glukopyranosa)



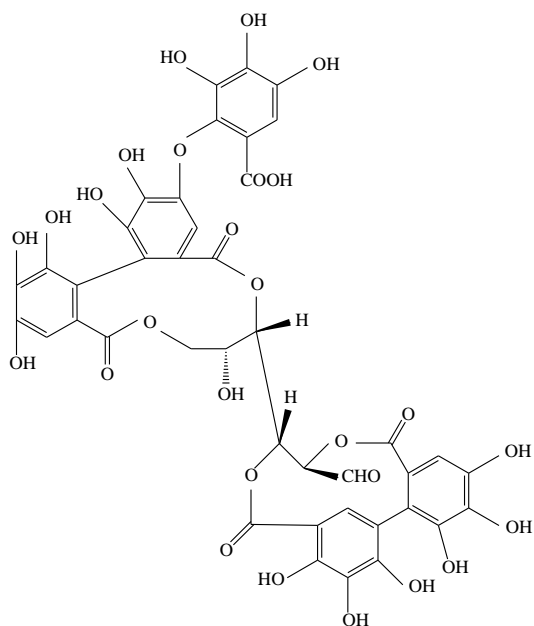
Sloučenina izolována z listu *A. japonica* ⁽⁶⁾

4,6-di-O-galloyl-D-glukosa (4,6-di-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glukopyranosa)



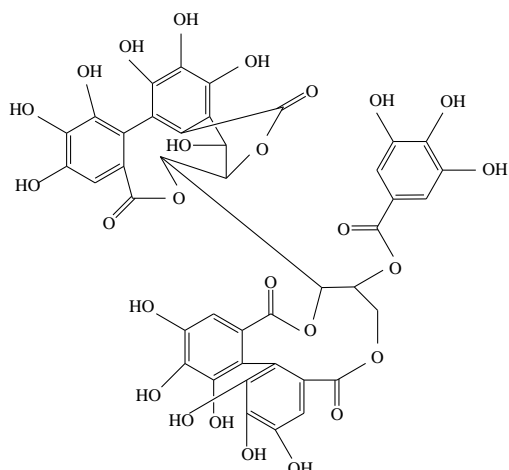
Sloučenina vyskytující se v listech *A. japonica* ⁽⁶⁾

Flosin A (D-Glukosa, cyklo 4->2:6->2'-[(1S)-4-(6-karboxy-2,3,4-trihydroxyfenoxy)-4',5,5',6,6'-pentahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat] cyklo 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat])



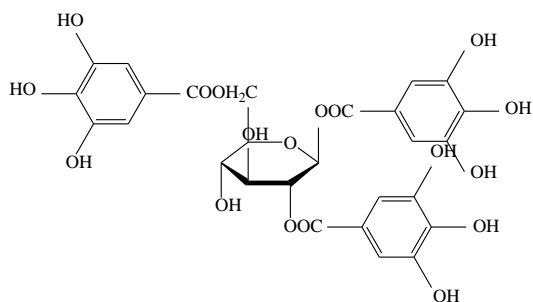
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁶⁾

Stachyurin (7H-Dibenzo[g,i][1,5]dioxacykloundecin derivát neovescalinu)



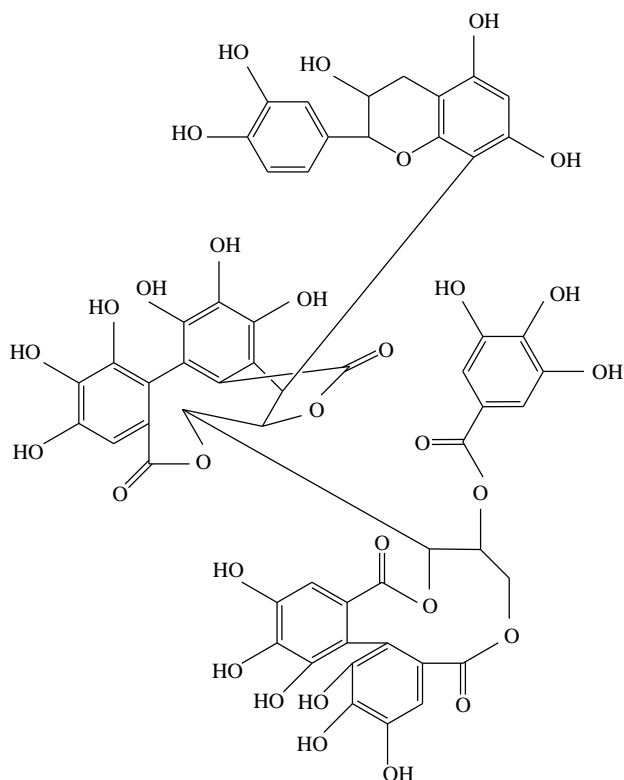
Sloučenina izolována z listů *A. japonica*, *A. sieboldiana* ^(5, 6)

1,2,6-tris-O-galloyl-β-D-glukosa (1,2,6-tris-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-β-D-glukopyranosa)



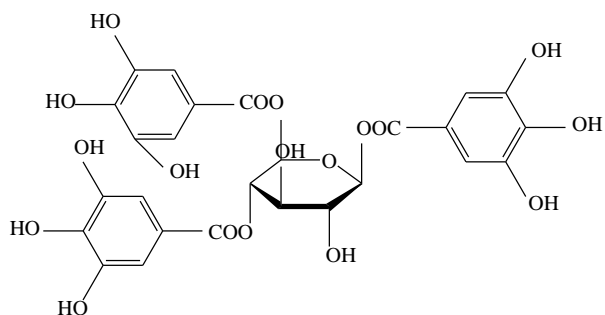
Galotanin izolován z listů *A. hirsuta* var. *microphylla*, *A. sieboldiana* ^(6, 7)

Stenofylanin A (7H-Dibenzo[g,i][1,5]dioxacykloundecin derivát neovescalinu)



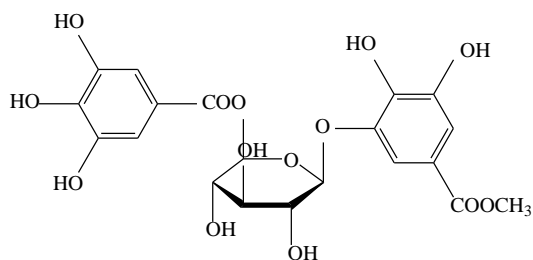
Sloučenina izolována z listů *A. sieboldiana* ⁽⁶⁾

1,4,6-tris-O-galloyl-β-glukosa (1,4,6-tris-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-β-D-glukopyranosa)



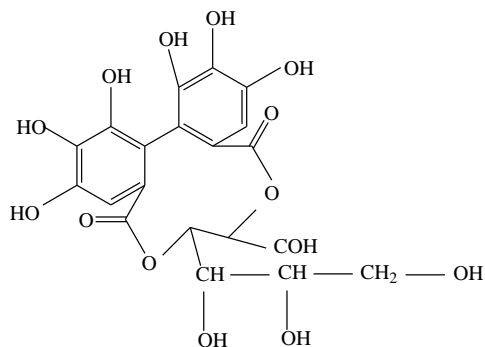
Sloučenina izolována z *A. hirsuta* var. *microphylla* ⁽⁸⁾

5-O-β-D-(6'-O-galloyl)glukopyranosid kyseliny gentisové (5-O-β-D-(6'-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)glukopyranosyloxy- 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina)



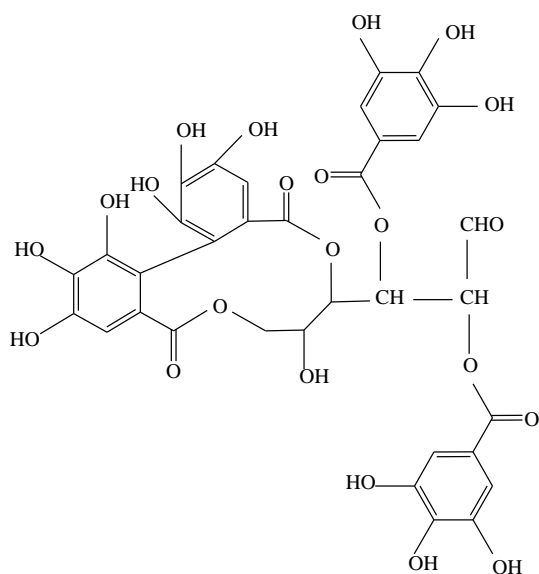
Sloučenina izolována z *A. hirsuta* var. *microphylla* ⁽⁸⁾

2,3-O-(S)-hexahydroxydifenoyl-D-glukosa (cyklo 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat-D-glukosa)



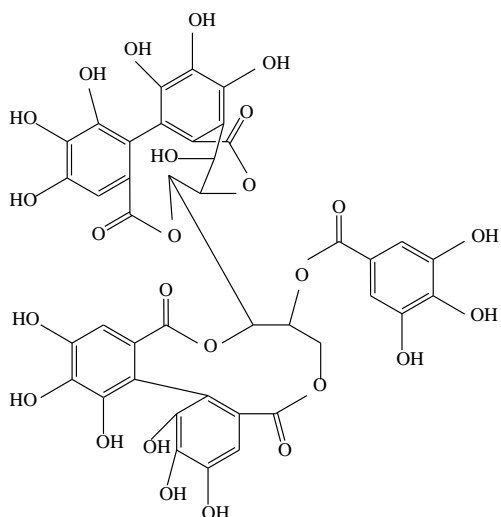
Sloučenina izolována z listů *A. hirsuta* var. *microphylla*, z plodů *A. sieboldiana* ^(4, 7)

Tellimagrandin I (cyklo 4,6-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat]-2,3-bis(3,4,5-trihydroxybenzoat)-D-glukosa)



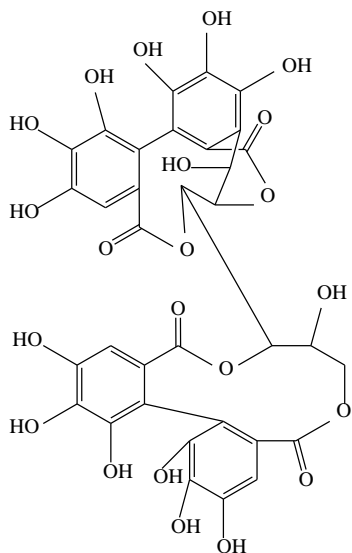
Sloučenina izolována z plodů *A. sieboldiana* ⁽⁴⁾

Casuarinin (cyklo 16,18-(4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat)-17-(3,4,5-trihydroxybenzoat)



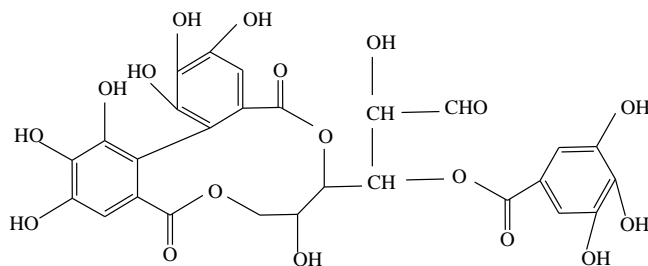
Casuarinin izolován z plodů, listů *A. sieboldiana* ^(4, 5, 6)

Casuariin (cyklo16,18-(4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat)



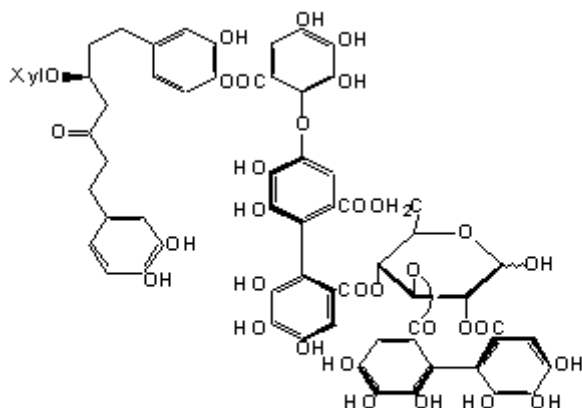
Sloučenina izolována z plodů *A. sieboldiana* ⁽⁴⁾

Gemin D (3-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydifenoyl-D-glukopyranosa)



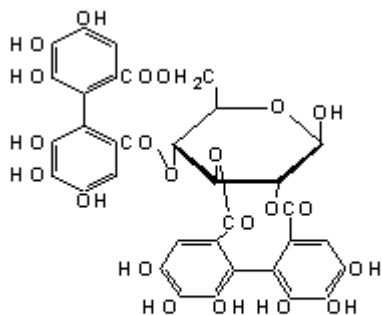
Gemin D byl izolován z listů *A. japonica* ⁽⁵⁾

Hirsunin (D-Glukosa, cyklo 4->2':6->2-[(1S)-4-[6-[[4-[(3S)-7-(3,4-dihydroxyfenyl)-5-oxo-3-(β-D-xylopyranosyloxy)heptyl]-2-hydroxyfenoxy]karbonyl]-2,3,4-trihydroxyfenoxy]-4',5,5',6,6'-pentahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat] cyklo 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyl]-2,2'-dikarboxylat])



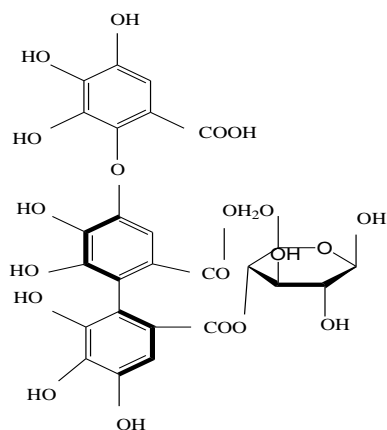
Sloučenina izolována z listů *A. hirsuta* var. *microphylla* ⁽⁸⁾

Pedunculagin (2,3;4,6-bis-(S)-hexahydroxydifenoyl-D-glukopyranosa)



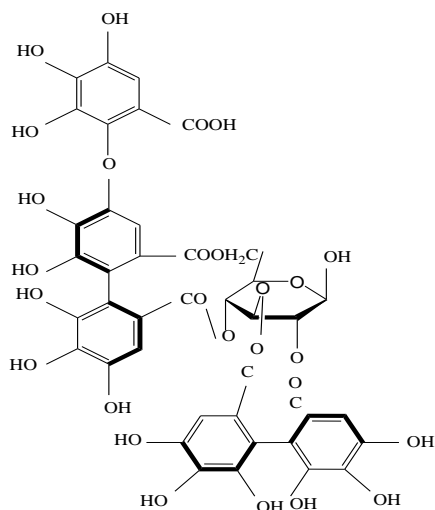
Pedunculagin izolován z *A. japonica*, *A. sieboldiana*, 1(β)-O-galloylpedunculagin z listů *A. sieboldiana* ^(5, 6)

4,6-(S)-valoneoyl-D-glukopyranosa (1,2,3-tris-O-degalloylrugosin A)



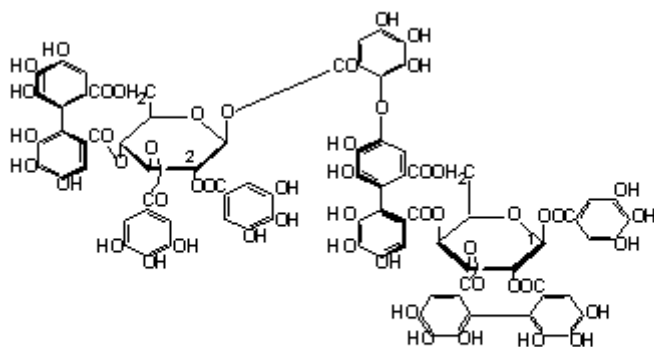
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵⁾

Praecoxin A (2,3-(S)-hexahydroxydifenyloxy-4,6-(S)-valoneoyl-β-D-glukopyranosa)



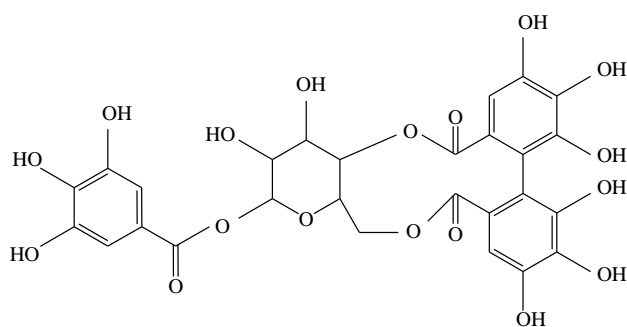
Sloučenina izolována z *A. japonica*, *A. hirsuta* ^(5, 8)

Rugosin F (β-D-Glukopyranosa, cyklo 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyloxy]-2,2'-dikarboxylat] cyklo 4->2':6->2-[(1S)-4-[6-[[[4,6-O-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahydroxy[1,1'-bifenyloxy]-2,2'-diyl]dikarbonyl]-2,3-bis-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy]karbonyl]-2,3,4-trihydroxyfenoxy]-4',5,5',6,6'-pentahydroxy[1,1'-bifenyloxy]-2,2'-dikarboxylat] 1-(3,4,5-trihydroxybenzoat))



Rugosin F izolován z listů *A. japonica*, *A. hirsuta* var. *microphylla*; Alnusjaponin A (1,2,3'-tri-O-degalloylrugosin F), 1-degalloylrugosin F z listů *A. hirsuta* var. *microphylla* ⁽⁵⁾

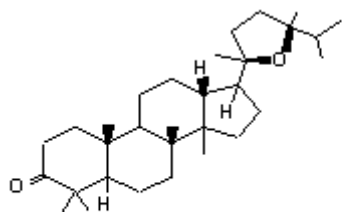
Strictinin (1-O-galloyl-4,6-hexahydroxydifenoyl- β -D-glukosa)



Sloučenina izolována z listů *A. siboldiana*, *A. japonica* ^(5, 6)

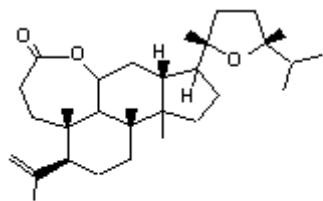
2.2.2 Triterpeny a steroidy

Alnincanon (20S,24R-epoxy-24-methyldammaran-3-on)



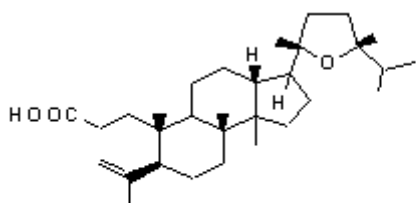
Sloučenina nacházející se v *A. incana*, v kůře *A. maximowiczii*, *A. viridis*; β -alnicanol (3-hydroxy derivát) v *A. maximowiczii* ^(9, 10, 11, 12, 13)

Alnusolid (20S,24R-epoxy-24-methyl-3,4-secodammar-4(28)-en-3,11- α -olid)



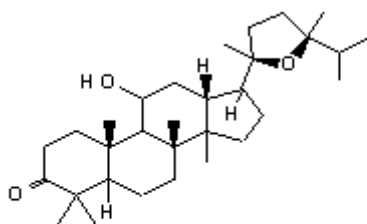
Sloučenina izolována z *A. serrulatoidea* ⁽¹⁴⁾

Alnuserová kyselina (20S,24R-epoxy-24-methyl-3,4-secodammar-4(28)-en-3-ová kyselina)



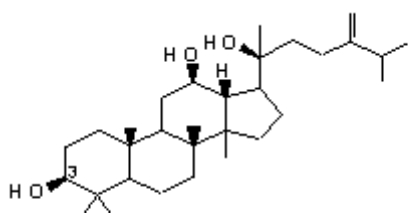
Sloučenina izolována z *A. serrulatoidea* ^(14, 15)

Alnuserol (20S,24R-epoxy-11- α -hydroxy-24-methyldammaran-3-on)



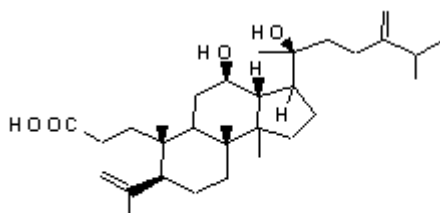
Sloučenina z *A. serrulatoidea* ^(16, 17)

Alnuserrutriol (24-methylendammarane-3- β ,12- β ,20S-triol)



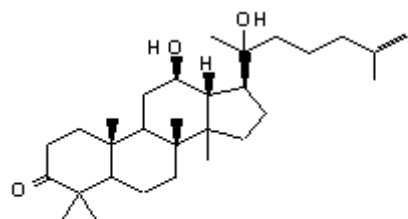
Alnuserrutriol a Alnuserrudiolon (3-oxo derivát) detegován v *A. serrulatoidea* ^(18, 19)

Alnustová kyselina (12,20-dihydroxy-24-methylen-3,4-secodammara-4(28)-en-3-ová kyselina)



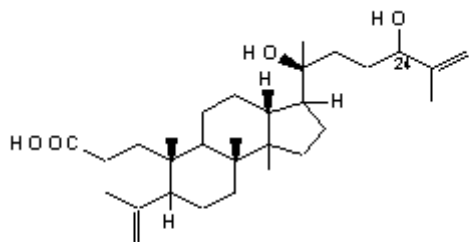
Kyselina alnustová a její glykosidy (12-O-(2'-O-acetyl)- α -L-arabinofuranosid; 12-O- α -arabinofuranosid; 12-O-(2'-O-acetyl)- β -D-xylopyranosid; 12-O- β -D-xylopyranosid; 12-O-(2'-O-acetyl)- β -D-glukopyranosid; 12-O- β -D-glukopyranosid) byly izolovány z květů *A. japonica*, *A. sieboldiana*; 12- deoxyalnustová kyselina z *A. pendula* ^(18, 20)

Alnusfoliendiolon (12,20-dihydroxydammar-25-en-3-on)



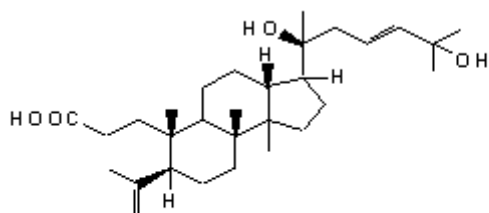
Sloučenina izolována z listů *A. glutinosa* ⁽²¹⁾

20,24-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28),25-dien-3-ová kyselina



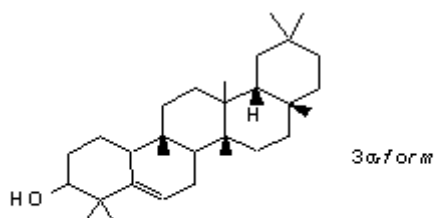
Sloučenina izolována z květů *A. japonica* ⁽²²⁾

20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-ová kyselina



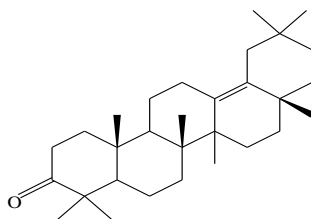
Sloučenina izolována z květů *A. japonica* ⁽²²⁾

Glutin-5-en-3-ol



Sloučenina izolována z *A. hirsuta*, *A. fruticosa*, *A. mandshurica*, *A. japonica*, *A. kamtschatica*; 3-beta forma se vyskytuje v *A. glutinosa*; 3-keton derivát (Alnusenon) se nachází v *A. glutinosa*, *A. barbata*, *A. japonica* ^(23, 24, 25)

δ -Amyron (13(18)-Oleanen-3-on)



Sloučenina vyskytující se v *Alnus spp.* ⁽²⁶⁾

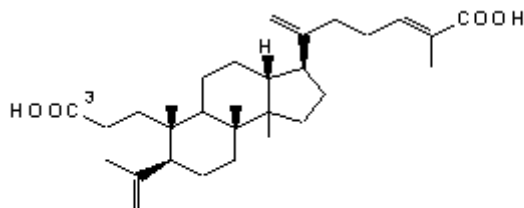
Lupeol (Lup-20(29)-en-3 β -ol)

Sloučenina izolována z kůry *A. oregona*, *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. viridis*, *A. barbata*, *A. subcordata*, *A. nepalensis*, *A. formosana*, *A. rubra*; Lupenon (3-keton derivát) izolován z kůry *A. japonica*, *A. glutinosa*, *A. rubra*, *A. formosana* ^(24, 27, 28, 29, 30, 34, 37, 37)

Betulin (lup-20(29)-en-3 β ,28-diol)

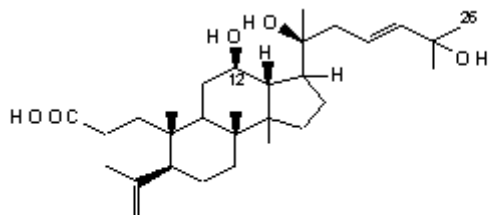
Sloučenina izolována z *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. oregona*, *A. viridis*, *A. barbata*, *A. subcordata*, *A. nepalensis*, *A. maximowiczii*, *A. rubra* ^(9, 27, 29, 34)

3,4-secodammara-4(28),20,24-trien-3,26-diová kyselina



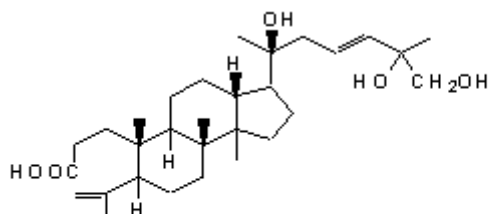
Kyselina a její 3-methylester izolován z květů *A. japonica* ⁽²²⁾

12,20,25-trihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-ová kyselina



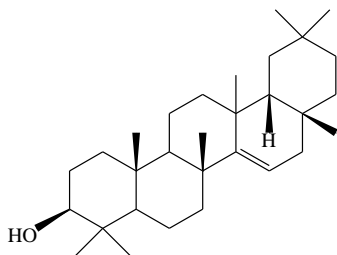
Sloučenina izolována z květů *A. japonica* ⁽²²⁾

20,25,26-trihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-ová kyselina



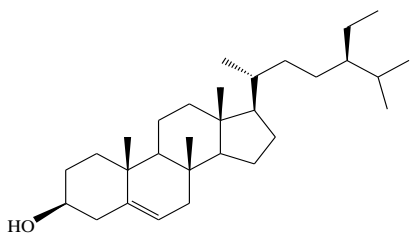
Sloučenina izolována z květů *A. japonica* ⁽²²⁾

Taraxerol (14-taraxeren-3-ol)



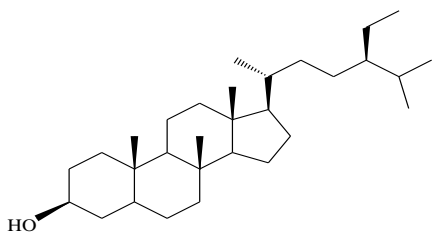
β - forma, taraxeron (3-oxo derivát), ester kys. octové izolovány z *Alnus spp.* (*A. glutinosa*, *A. rubra*, *A. japonica*, *A. incana*, *A. serrulata*, *A. viridis*, *A. formosana*, *A. nepalensis*) ^(9, 10, 11, 13, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35)

β - Sitosterol (stigmat-5-en-3-ol)



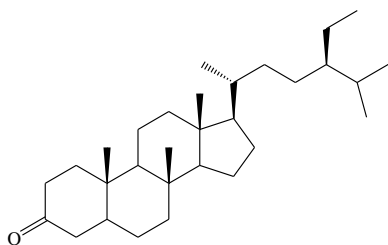
Vyskytuje se jako aglykon a glykosid; aglykon izolován z *Alnus spp.* (*A. glutinosa*, *A. hirsuta*, *A. fruticosa*, *A. mandshurica*, *A. kamtschatica*, *A. rubra*, *A. cordata*, *A. japonica*, *A. formosana*, *A. nepalensis*, ...); β -sitosterol- β -D-glukosid izolován z kmene *A. formosana* ^(23, 26, 29, 31, 34, 36, 37)

stigmastanol (stigmastan-3-ol)



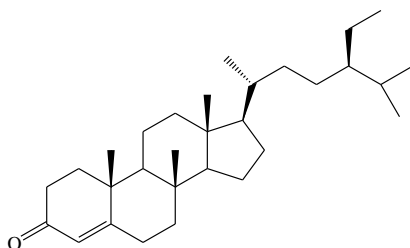
Sloučenina izolována ze dřeva *A. japonica* ⁽³¹⁾

Stigmastanon (stigmastn-3-on)



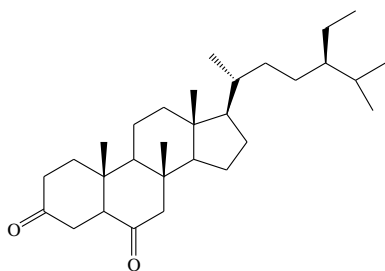
Sloučenina izolována ze dřeva *A. japonica*, *A. formosana* ^(31, 37)

Stigmast-4-en-3-on



Sloučenina izolována z kmene *A. formosana* ⁽³⁷⁾

Stigmastan-3,6-dion



Sloučenina izolována z kmene *A. formosana* ⁽³⁷⁾

Aldehyd 3-O-acetyloleanové kyseliny(3 β -acetyloxyolean-12-en-28-al)

Sloučenina izolována z *A. japonica*, *A. formosana* ^(31, 37)

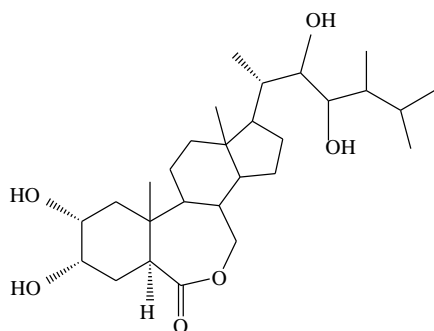
Erythrodiol-3-acetát (3 β -acetoxy-28-hydroxyolean-12-en)

Sloučenina izolována z *A. japonica* ⁽³¹⁾

Betulinová kyselina (lup-20(29)-en-28-karboxylová kyselina)

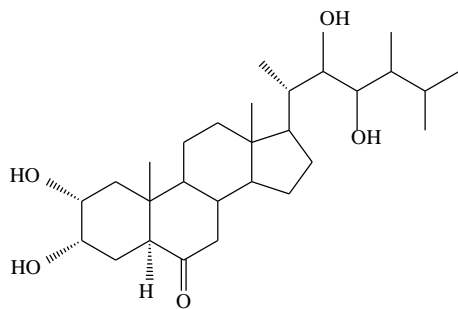
Sloučenina izolována ze dřeva *A. japonica*, *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. viridis*, *A. barbata*, *A. subcordata*, *A. nepalensis*, *A. maximowiczii* ^(9, 27, 29, 31,31)

Brassinolid ((3a*S*,5*S*,6*R*,7a*R*,7b*S*,9a*S*,10*R*,12a*S*,12b*S*)-10-[(1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-2,3-dihydroxy-1,4,5-trimethylhexyl]hexadekahydro-5,6-dihydroxy-7a,9a-dimethyl-3*H*-benzo[*c*]indeno[5,4-*e*]oxepin-3-on)



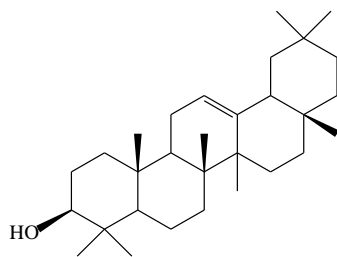
Sloučenina izolována z pylu *A. glutinosa* ⁽³⁸⁾

Castasteron (6-oxo-campestan-2α,3α,22*R*,23*R*-tetraol)



Sloučenina izolována z pylu *A. glutinosa* ⁽³⁸⁾

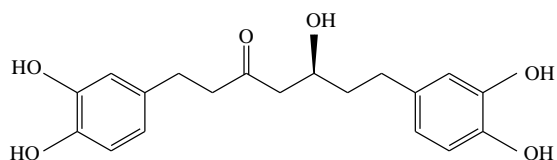
β -amyrin (olean-12-en-3β-ol)



β-amyrin a 3-O-acetyl-β-amyrin izolován z listů *A. japonica* ⁽²⁴⁾

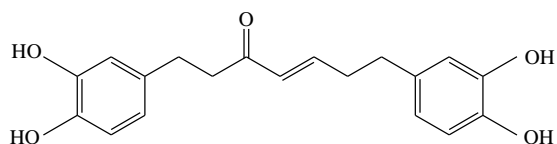
2.2.3 Diarylheptanoidy

Hirsutanonol ((5*S*)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxyheptan-3-on)



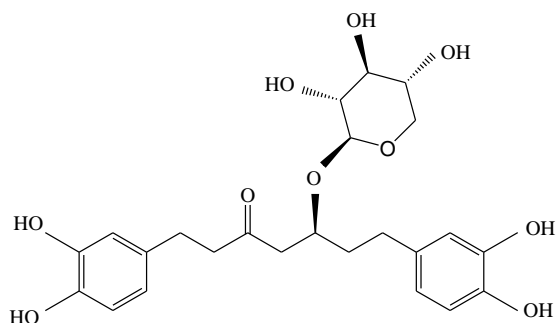
Aglykon izolován z *A. serrulatoidea*, *A. hirsuta*, *A. glutinosa*; glykosid hirsutanonol-5-O- β -D-glukopyranosid izolován z *A. serrulatoidea*, *A. rubra*, z listů *A. japonica*; hirsutanonol-O-(6-O-galloyl)- β -D-glukopyranosid; 3-deoxo-hirsutanonol 5-O- β -D-glukopyranosid; 3-deoxohirsutanonol 5-O-(6-O- β -D-apiosyl)- β -D-glukopyranosid z listů *A. japonica* ^(23, 24, 39, 40)

Hirsutenon (1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)hept-4-en-3-on)



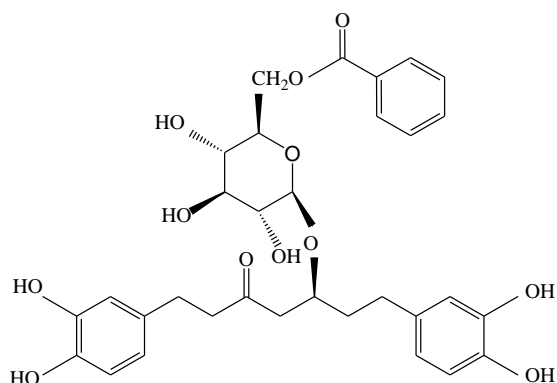
Sloučenina izolována z listů *A. japonica*, *A. hirsuta* ^(24, 41, 42)

Oregonin ((5S)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)heptan-3-on-5-xylopyranosid)



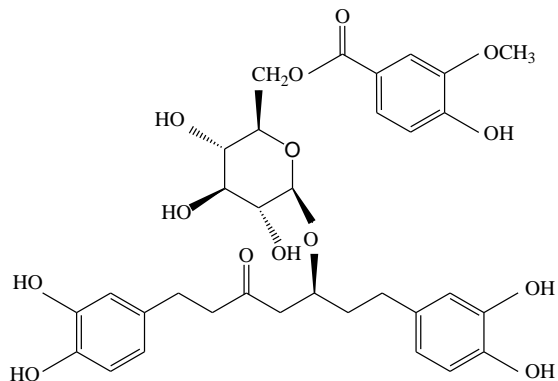
Izolován z *A. rubra*, *A. hirsuta*, *A. glutinosa*, *A. japonica*, *A. formosana* a jiných druhů *Alnus* spp.; 2'''-cinnamoyloregegin byl izolován z listů *A. formosana* ^(33, 40, 41, 43, 44)

Oregonosid A ((5S)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-O-(6-O-benzoyl- β -D-glukopyranosyl)heptan-3-on)



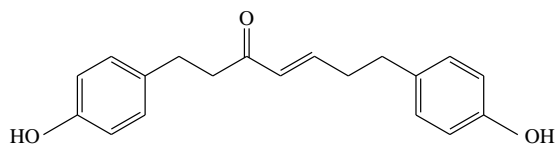
Sloučenina izolována z kůry *A. rubra* ⁽⁴⁵⁾

Oregonosid B ((5S)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-O-(6-vanilloyl-β-D-glukopyranosyl)heptan-3-on)



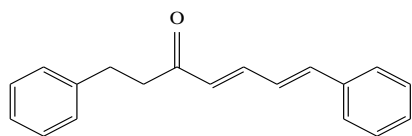
Sloučenina izolována z kůry *A. rubra* ⁽⁴³⁾

1,7-bis-(4-hydroxyfenyl)hept-4-en-3-on



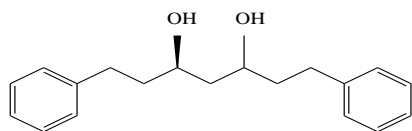
Sloučenina izolována se v *A. rubra*, *A. japonica* ^(46, 47)

Alnuston (1,7-difenyl-4,6-heptadien-3-on)



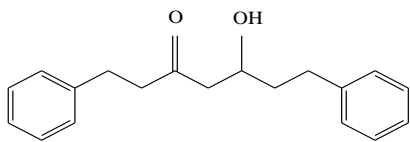
Sloučenina izolována se v *A. pendula* ⁽⁴⁸⁾

Yashabushidiol B (3R,5R)-1,7-difenylheptan-3,5-diol), **Yashabushidiol A** ((3R,5SR)- 1,7-difenylheptan-3,5-diol)



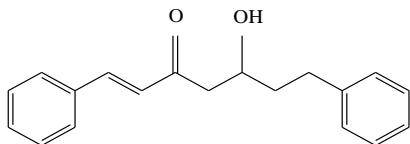
Sloučeniny izolovány ze samčích květů *A. sieboldiana*, z listů *A. fruticosa*, *A. mandshurica* ⁽⁴⁹⁾

Dihydroyashabushiketol (5-hydroxy-1,7-difenylheptan-3-on)



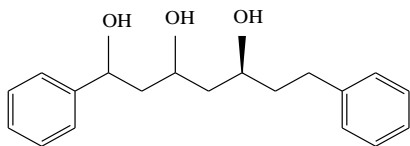
Sloučenina samčích květů *A. sieboldiana*, *A. firma* ⁽⁴⁷⁾

Yashabushiketol (5-hydroxy-1,7-fenylhept-1-en-3-on)



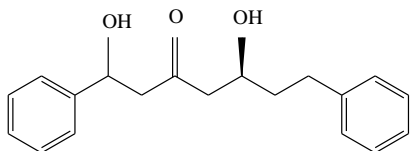
Sloučenina izolována ze samčích květů *A. sieboldiana*, *A. firma* ⁽⁴⁷⁾

Yashabushitriol (1R,3R,5S)-1,7-difenyl-1,3,5-heptantriol)



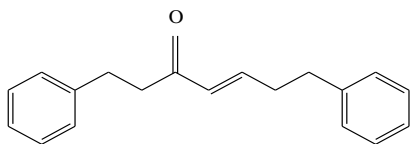
Sloučenina izolována ze samčích květů *A. sieboldiana* ⁽⁴⁷⁾

Yashabushiketodiol A (1,5-dihydroxy-1,7-difenylheptan-3-on)



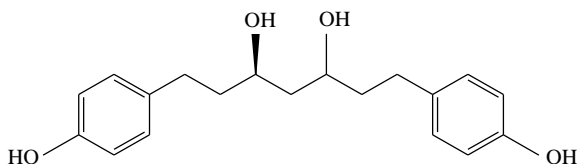
Yashabushiketodiol A, Yashabushiketodiol B (1-epimer) izolovány ze samčích listů *A. sieboldiana* ⁽⁴⁷⁾

1,7-difenylhept-4-en-3-on



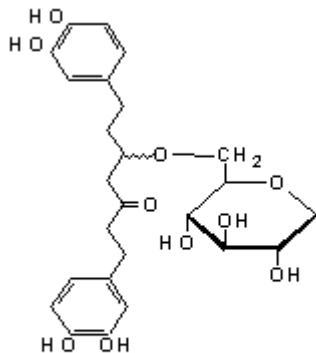
Sloučenina izolována z *A. maximowiczii* ⁽⁴⁶⁾

Hannokinol (1,7-bis(4-hydroxyfenyl)heptan-3,5-diol)



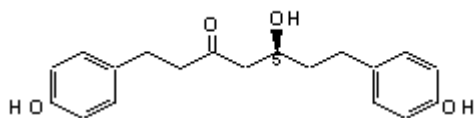
Sloučenina izolována ze dřeva *A.hirsuta*, *A.japonica* ⁽²⁶⁾

Hirsutosid (1,5-Anhydro-6-O-[5-(3,4-dihydroxyfenyl)-1-[2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethyl]-3-oxopentyl]-D-glucitol



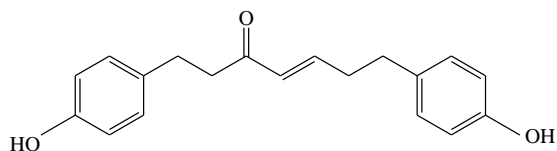
Sloučenina izolována ze zelené kůry *A. hirsuta*, *A. japonica* ^(24, 50)

Hannokinin (5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyfenyl)heptan-3-on)



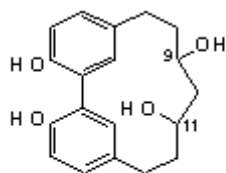
Aglykon izolován z *A. japonica*; 5-O- β -D-xylopyranosid a 5-O- β -glukopyranosid (Platyphyllolid) izolovány z kůry *A. rubra*, z listů *A. formosana*, *A. hirsuta* ^(23, 31, 33, 51)

1,7- bis(4-hydroxyfenyl)hept-3-en-5-on



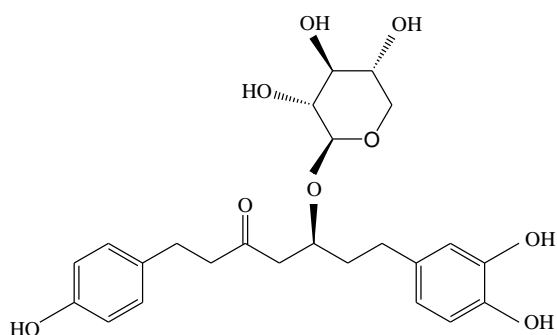
Sloučenina izolována z *A. japonica* ⁽³¹⁾

Alnusdiol (tricyklo[12.3.1.12,6]nonadeka-1(18),2,4,6(19),14,16-hexaene-3,9,11,17-tetrol)



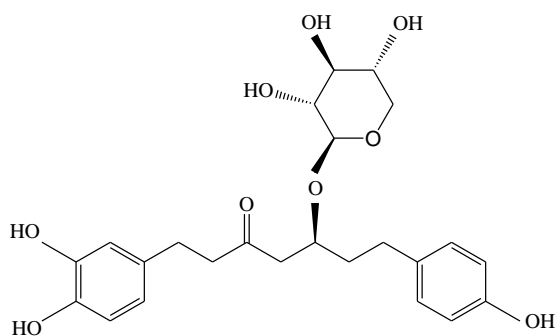
Alnusdiol ze dřeva *A. japonica* ⁽³¹⁾, *A. hirsuta* ⁽⁵²⁾, jeho deriváty Alnusonol (9- oxoderivát Alnusdiolu), Alnuson (derivát alnusdiolu; v poloze 11 keton, v poloze 9,10 dvojná vazba), Alnusoxid (derivát Alnusdiolu; 9,10 epoxid, 11 keton) izolovány ze dřeva *A. japonica* ⁽³¹⁾

7-(3,4-dihydroxy)-5-hydroxy-1-(4-hydroxyfenyl)heptan-3-on-5-O-β-D-xylopyranosid



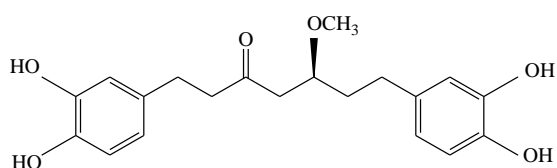
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵³⁾

1-(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxy-7-(4-hydroxyfenyl)heptan-3-on-5-O-β-D-xylopyranosid



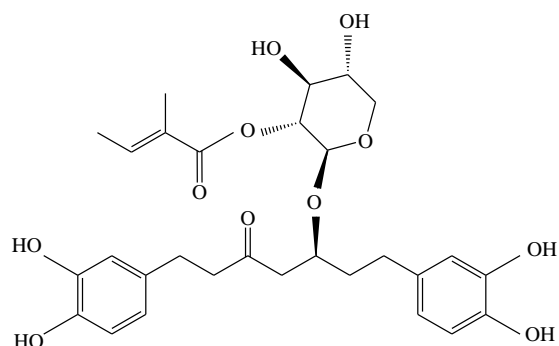
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵³⁾

1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-methoxyheptan-3-on



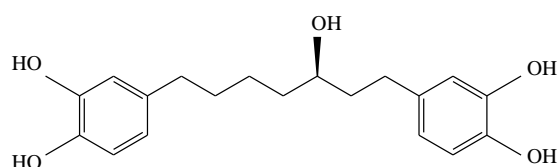
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵³⁾

1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxyheptan-3-on-5-O-[2-(2-methylbutenoyl)]-β-D-xylopyranosid



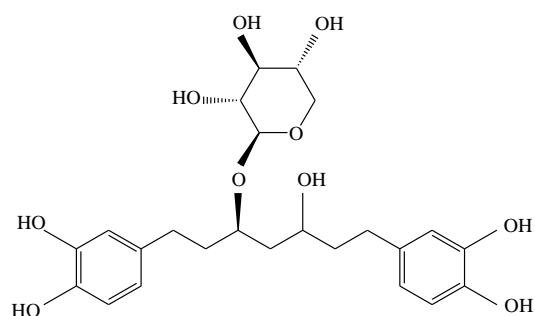
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵³⁾

(5R)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)heptan-5-ol



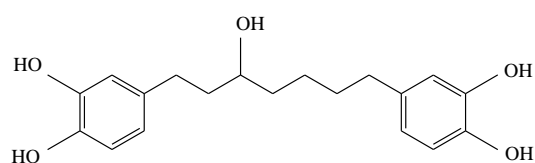
Aglykon i glykosid 5-O-β-D-glukopyranosid izolován z kůry *A. hirsuta*, *A. japonica*, 5-O-β-D-xylopyranosid izolován z listů *A. hirsuta* ^(44, 48, 55)

1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxyheptan-3-O-β-D-xylopyranosid



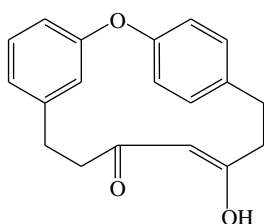
Sloučenina izolována z kůry *A. japonica* ⁽⁵⁴⁾

Rubranol ((5R)- (1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)heptan-3-on)



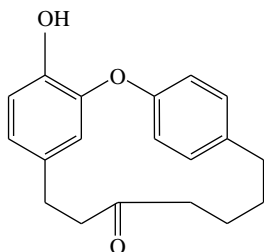
Rubranol je aglykonem rubranosidů; Rubranosid A (Rubranol-3-O-β-D-glukopyranosid) izolován z listů *A. hirsuta*, *A. rubra*, *A. japonica*; Rubranosid B (Rubranol-3-O-β-D-xylopyranosid z kůry *A. japonica*, *A. rubra*; Rubranosid C (Rubranol-3-O-β-D-glukopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosid z kůry *A. rubra*, *A. japonica*; Rubranosid D (Rubranol-3-O-β-D-apiofuranosyl(1→6)-β-D-glukopyranosid) z kůry *A. japonica*, *A. rubra* (24, 44, 45 55, 55, 56, 57)

Garugamblin-3 (2-oxatricyklo[13.2.2.1^{3,7}]eicosa-12-hydroxy-3,5,7(20),11,15,17,18-heptaen-10-on)



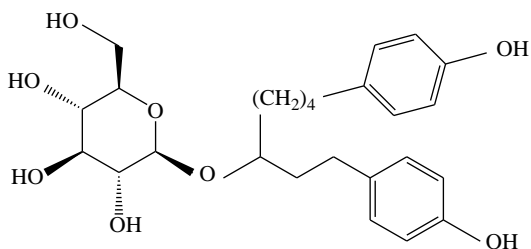
Sloučenina izolována z plodů *A. japonica* ⁽⁵⁸⁾

Acerogenin L (2-oxatricyklo[13.2.2.1^{3,7}]eicosa-4-hydroxy-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-on)



Sloučenina izolována z plodů *A. japonica* ⁽⁵¹⁾

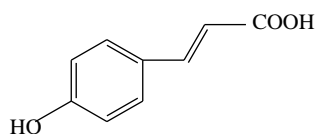
Acerosid VII ((1R)-5-(4-hydroxyfenyl)-1-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]pentyl-O-β-D-glukopyranosid)



Sloučenina izolována z listů *A. formosana* ⁽³³⁾

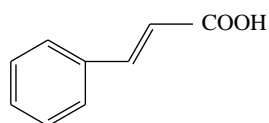
2.2.4 Látky odvozené od fenypropanu

Kyselina hydroxyskořicová (p-hydroxyfenylprop-2-enová kyselina)



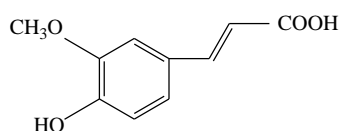
Sloučenina izolována z *Alnus spp.* ^(48, 59)

Kyselina skořicová (4-hydroxyfenylprop-2-(*E*)-enová kyselina)



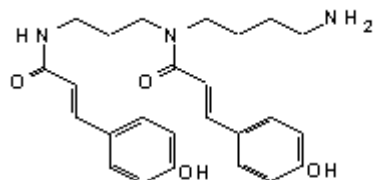
Sloučenina izolována z *A. glutinosa*, *A. pendula*, *A. firma* ^(48, 60, 61)

Kyselina ferulová (3-(4-hydroxy-5-methoxyfenyl)prop-2-enová kyselina)



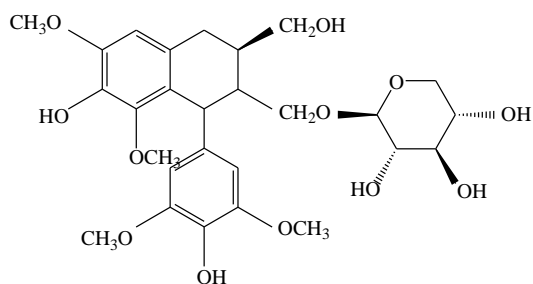
Sloučenina izolována z *A. glutinosa* ⁽⁴⁸⁾

Spermidindiamid kyseliny hydroxyskořicové (N1,N5-Di-(4-hydroxycinnamoyl)spermidin)



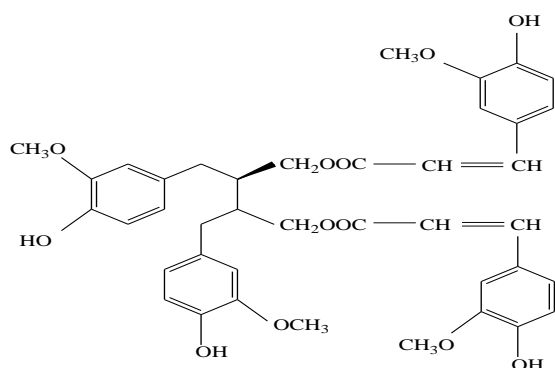
Sloučenina vyskytující se v *A. glutinosa* ⁽⁶²⁾

Lyonsid (4,4',9,9'-tetrahydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxy-2,7'-cyklolignan-9'-O-β-D-xylopyranosid)



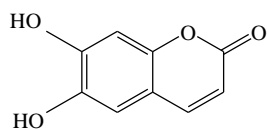
Sloučenina vyskytující se v *A. glutinosa* ⁽⁴⁸⁾

Secoisolaricirasinol-9,9'-diferulát



Sloučenina izolována ze dřeva *A. japonica* ⁽³¹⁾

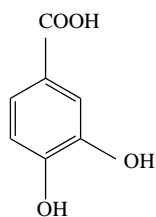
Eskuletin (6,7-dihydroxykumarin)



Sloučenina izolována z kůry *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. sibirica*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. rubra* ⁽³⁾

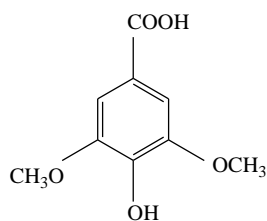
2.2.5 Deriváty kyseliny benzoové a hexahydroxydifenové

3,4-dihydroxybenzoová kyselina



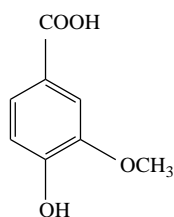
Vyskytuje se v *Alnus spp.* ⁽⁴⁶⁾

Šeříková kyselina (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoová kyselina)



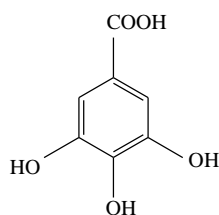
Sloučenina izolována z *A. japonica*, *A. rubra* ^(31, 63)

Vanilinová kyselina (4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina)



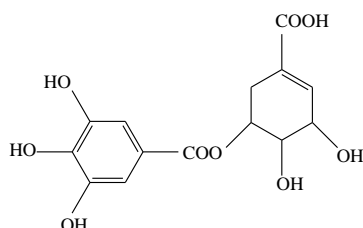
Sloučenina izolována z *A. japonica*, *A. rubra*, *A. glutinosa* ^(31, 48, 63)

Gallová kyselina (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina)



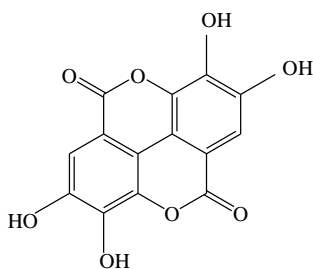
Sloučenina izolována z kůry *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. sibirica*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. rubra* ⁽³⁾

5-O-galloyl(-)-šikimová kyselina (5-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-3,4-dihydroxycyklohex-1-enkarboxylová kyselina)



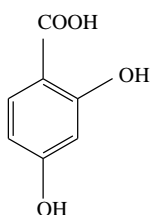
Sloučenina izolována z listů *A. japonica* ⁽⁵⁾

Ellagová kyselina (2,6,2',6'-dilakton 4,4',5,5',6,6'-hexahydroxydifenové kyseliny)



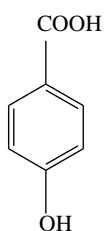
Sloučenina izolována z *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. sibirica*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. rubra*
(3)

2,4-dihydroxybenzoová kyselina



Sloučenina izolována z listů *A. formosana* ⁽³³⁾

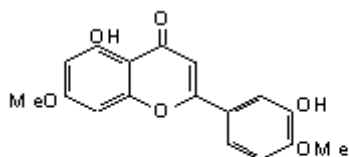
p-hydroxybenzoová kyselina (4-hydroxybenzoová kyselina)



Sloučenina izolována z *A. glutinosa* ⁽⁶⁴⁾

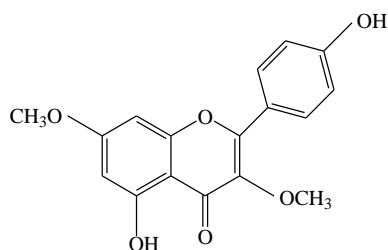
2.2.6 Flavonoidy

3',5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavon



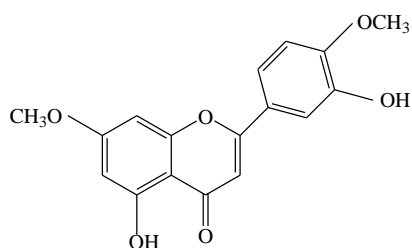
Sloučenina izolována z *A. japonica* ⁽⁶⁵⁾

Kumatakenin (4',5-dihydroxy-3,7-dimethoxyflavon)



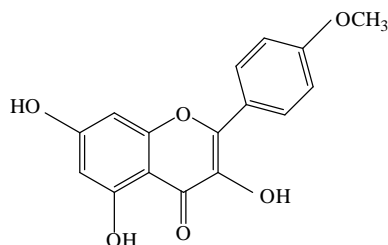
Sloučenina izolována z pupenů *A. crispa*, *A. sinuata* ⁽⁶⁵⁾

7,4'-dimethoxyluteolin (3',5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavon)



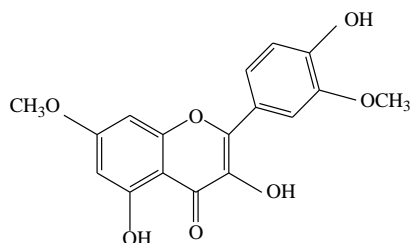
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica* ⁽⁶⁵⁾

Kempferid (4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon)



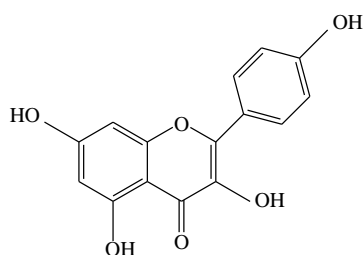
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica*, *A. koehnei* ⁽⁶⁵⁾

Rhamnazin (3',7-dimethoxy-3,4',5-trihydroxyflavon)



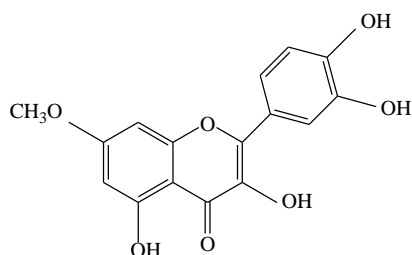
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica*, *A. koehnei* ⁽⁶⁵⁾

Kempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavon)



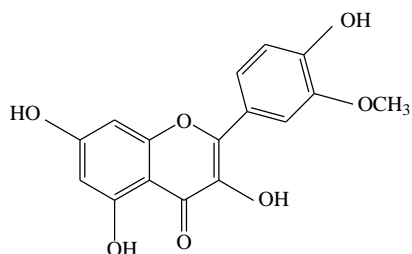
Sloučenina izolována z *A. koehnei*, z kůry *A. japonica*, *A. rubra*, *A. maximowiczii* a *A. hirsuta*; Kempferol-3-O- α -L-rhamnosid byl izolován z listů *A. formosana* ^(3, 65)

Rhamnetin (7-methoxy-3,5,3',4'-tetrahydroxyflavon)



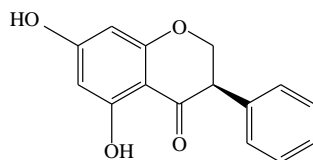
Aglykon izolován z pupenů *A. koehnei*; glykosid Rhamnetin-3-O- α -L-rhamnosid izolován z *A. formosana* ^(15, 33)

Isorhamnetin (3'-methoxy-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon)



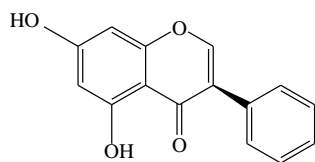
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica*, *A. koehnei* ⁽⁶⁵⁾

Pinocembrin (5,7-dihydroxyflavanon)



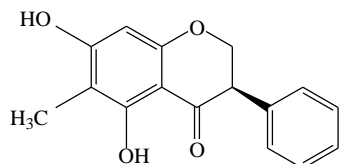
Pinocembrin, Pinostrobin (7-methoxy derivát Pinocembrinu) izolovány z *Alnus spp.* ⁽⁶⁾

5,7-dihydroxyflavon (5,7-dihydroxy-2-fenyl-4H-1-benzopyran-4-on)



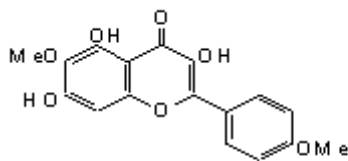
5,7-dihydroxyflavon a Tectochrysin (5-hydroxy-7-methoxyflavon) izolován z *A. sieboldiana* (48)

Strobopinin (5,7-dihydroxy-6-methylflavanon)



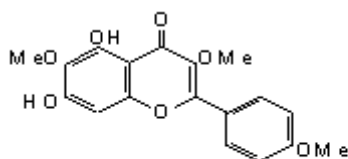
Strobopinin se vyskytuje v *A. sieboldiana* ve formě glykosidu jako Strobopinin-7-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosid (48)

Betuletol (4',6-dimethoxy-3,5,7-trihydroxyflavon)



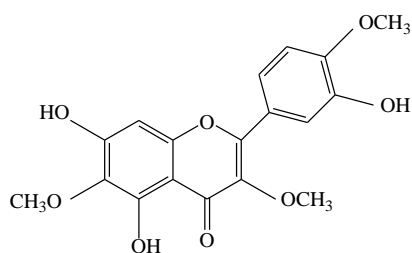
Sloučenina izolována z *Alnus* spp. (*A. koehnei*) (65, 66)

3-methoxybetuletol (5,7-dihydroxy-3,4',6-trimethoxyflavon)



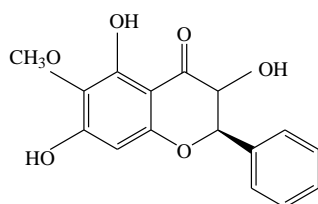
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica*, *A. koehnei* (65)

Centaureidin (5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavon)



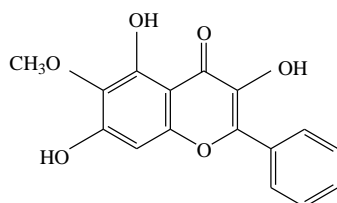
Sloučenina izolována z pupenů *A. koehnei* ⁽⁶⁵⁾

Alnustinol (6-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavanon)



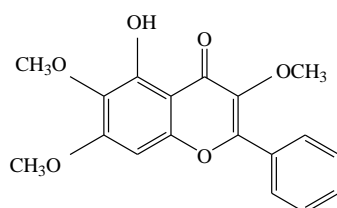
Sloučenina izolována z *A. pendula*, *A. sieboldiana* ⁽⁴⁸⁾

Alnusin (6-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon)



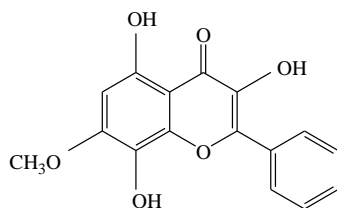
Sloučenina izolována z *A. sieboldiana* ⁽⁴⁸⁾

Alnustin (5-hydroxy-3,6,7-trimethoxyflavon)



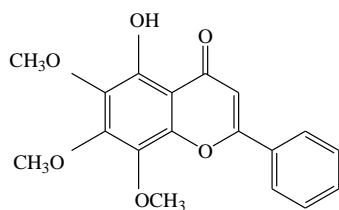
Sloučenina izolována z *A. sieboldiana* ⁽⁴⁸⁾

7-methoxy-3,5,8-trihydroxyflavon



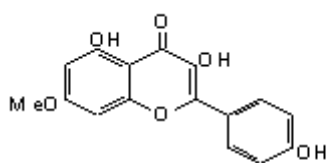
Sloučenina izolována z *A. sieboldiana* ⁽⁴⁸⁾

Alnetin (5-hydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon)



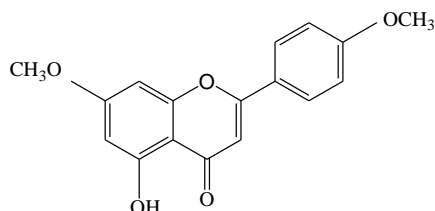
Sloučenina izolována z *A. sieboldiana* ⁽⁴⁸⁾

Rhamnocitrin (7-methoxy-3,4',5-trihydroxyflavon)



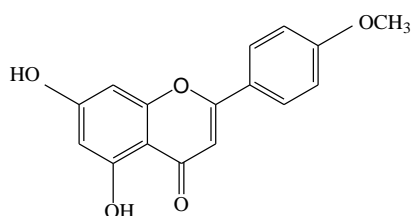
Sloučenina izolována z *Alnus spp.* ⁽⁴⁸⁾

7,4'-dimethoxy-5-hydroxyflavon



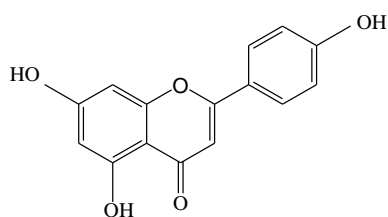
Sloučenina izolována ze semen *A. rubra* ⁽⁶⁷⁾

Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon)



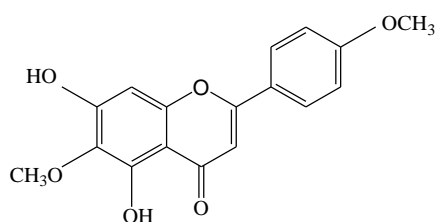
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica* a *A. koehnei*, ze semen *A. rubra* ^(58, 60, 65)

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavon)



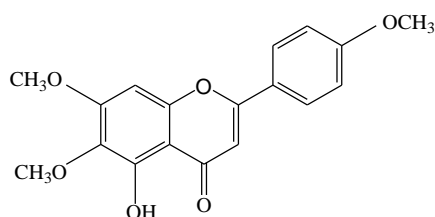
Sloučenina izolována ze semen *A. rubra*; 7,4'-dimethoxyapigenin izolován z pupenů *A. japonica* ^(60, 65)

Pectolinarigenin (5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon)



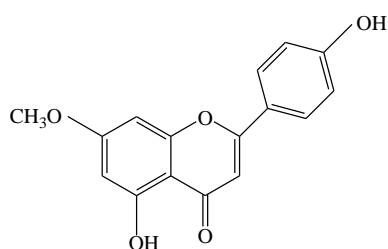
Sloučenina izolována z pupenů *A. japonica*, ze semen *A. rubra* ^(60, 65)

Salvigenin (5-hydroxy-4',6,7-trimethoxyflavon)



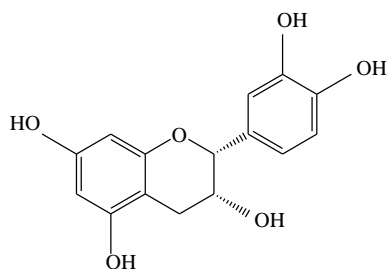
Sloučenina izolována ze semen *A. rubra*, z pupenů *A. japonica* a *A. koehnei* ^(60, 65)

Genkwanin (5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavon)



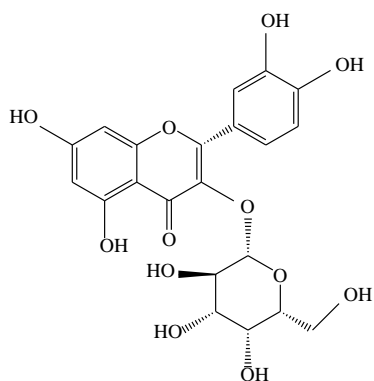
Sloučenina izolována z pupenů *A. sinuata*, ze semen *A. glutinosa* ^(40, 65)

(-)-Epikatechin ((-)-(2R,3R)-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol)



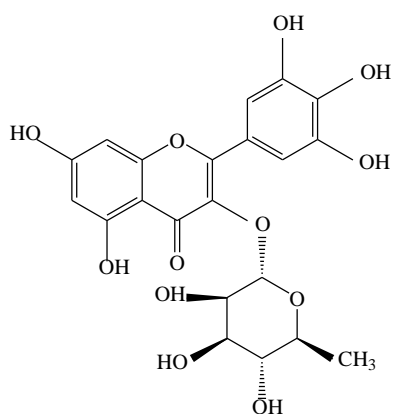
Katechin se vyskytuje ve dvou isoformách; isomer (-)-epikatechin (2R,3R) izolován z listů *A. hirsuta*; isomer (+)-katechin (2R,3S) v kůře *Alnus spp.* ^(59, 68)

Hyperosid (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-O-β-D-galaktopyranosid)



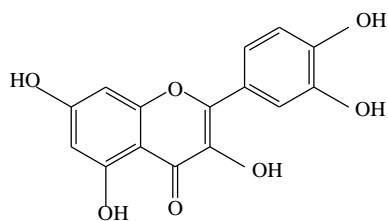
Sloučenina izolována z listů a kůry *A. hirsuta*; z kůry *A. japonica*, *A. rubra*, *A. maximowiczii*, *A. glutinosa* ^(3, 28, 68)

Myricetin-3-O-α-L-rhamnosid (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon-3-O-α-L-rhamnopyranosid)



Sloučenina izolována z listů *A. maximowiczii* ⁽⁶⁹⁾

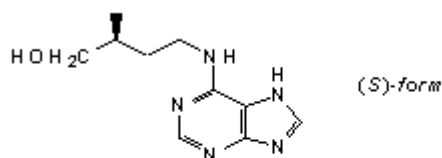
Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon)



Kvercetin se vyskytuje jako aglykon, glykosid, methoxyderivát ; aglykon izolován z kůry *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. sibirica*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. rubra*, z listů *A. formosana*; kvercetin-3-β-D-glukopyranosyl-4-O-β-D-glukopyranosid izolován z pylu *A. sieboldiana*, kvercetin-3-O-β-D-glukuronopyranosid z listů *A. hirsuta*, kvercetin-3-O-β-D-glukopyranosid z listů *A. maximowiczii*, *A. formosana*, kvercetin-3-O-α-L-rhamnosid z listů *A. maximowiczii*, *A. formosana*, *A. japonica*; 3,7-dimethoxykvercetin z pupenů *A. crispa*, *A. koehnei*, *A. sinuata*, 3,7,4'-trimethoxykvercetin z pupenů *A. crispa*, 3,3'-dimethoxykvercetin z pupenů *A. koehnei*, 7,3',4'-trimethoxykvercetin z pupenů *A. japonica* ^(3, 24, 33, 68, 65, 69)

2.2.7 Derivát adeninu

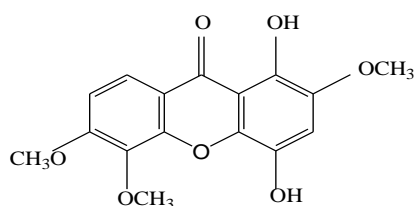
Dihydrozeatin (6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin)



Dihydrozeatin-O-glukosid se vyskytuje v různých druzích rostlin, včetně *Alnus spp.* ⁽⁷⁰⁾

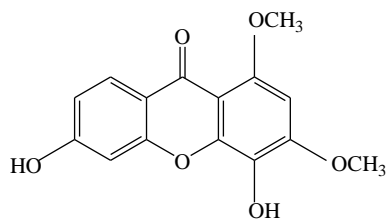
2.2.8 Xanthony

1,4-dihydroxy-2,5,6-trimethoxyxanthon



Sloučenina izolována z *A. glutinosa* ⁽⁴⁸⁾

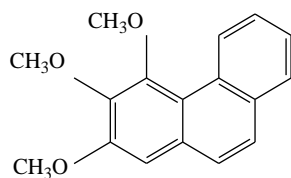
4,6-dihydroxy-1,3-dimethoxyxanthon



Sloučenina izolována z *A. glutinosa* ⁽⁴⁸⁾

2.2.9 Fenanthren

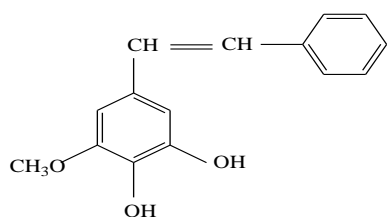
2,3,4-trimethoxyfenanthren



Sloučenina izolován z *A. maximowiczii* ⁽⁷¹⁾

2.2.10 Derivát stilbenu

3,4-dihydroxy-5-methoxystilben (1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyfenyl)-2-fenylethylen)



Sloučenina izolována z *A. viridis* ⁽⁷²⁾

2.2.11 Aminokyseliny

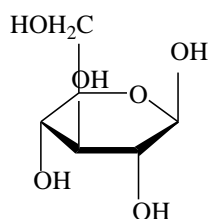
Tab. 1 volné aminokyseliny v uzlinách kořenů v μmol dusíku na gram čerstvé hmotnosti

Druh	Asparagová kyselina	Glutamová kyselina	Citrulin	Asparagin	Glutamin	Ostatní AK*	Celk. množ. dusíku v AK
<i>Alnus glutinosa</i>	0,25	0,78	1,25	nedetekován	0,30	0,60	3,18
<i>Alnus inokumai</i>	0,08	0,96	0,89	0,99	1,02	0,66	3,60

Ostatní detekované AK: threonin, serin, glycin, alanin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, γ -aminoisomáselná kyselina, ornithin, lysin, histidin a arginin; prolin nebyl detekován u druhu *Alnus* ⁽⁷³⁾

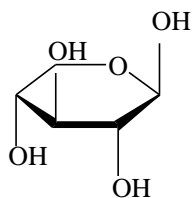
2.2.12 Monosacharidy

Glukosa (D-gluco-hexosa)



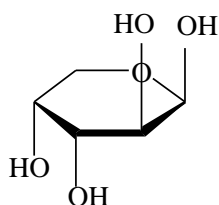
Izolována z *A. rubra* ⁽³⁴⁾

Xylosa (D-xylo-pentosa)



Izolována z *A. rubra* ⁽³⁴⁾

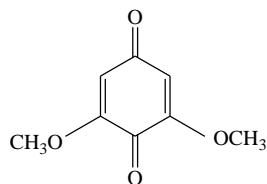
Arabinosa (D-arabino-pentosa)



Izolována z *A. rubra* ⁽³⁴⁾

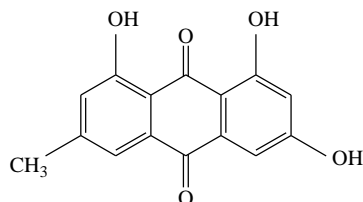
2.2.13 Chinony

2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon



Sloučenina izolována ze dřeva *A. japonica*, *A. glutinosa* ^(31, 74)

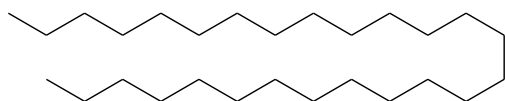
Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthrachinon)



Sloučenina izolována z kůry *A. glutinosa* ⁽²⁸⁾

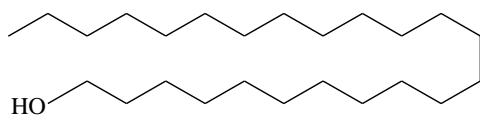
2.2.14 Vyšší alifatické uhlovodíky, alkoholy a kyseliny

Heptakosan ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{25}-\text{CH}_3$)



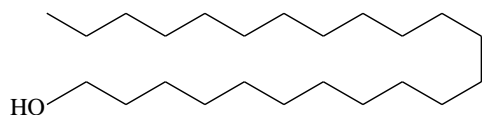
Sloučenina izolována z listů *A. hirsuta*, *A. fruticosa*, *A. mandshurica*, *A. japonica*, *A. kamtschatica* ⁽²⁶⁾

Tetrakosanol ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{23}-\text{OH}$)



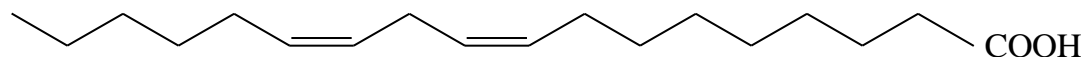
Sloučenina izolována z listů *A. hirsuta*, *A. fruticosa*, *A. mandshurica*, *A. japonica*, *A. kamtschatica* ⁽²⁶⁾

Trikosanol ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{OH}$)



Sloučenina izolována z listů *A. hirsuta*, *A. fruticosa*, *A. mandshurica*, *A. japonica*, *A. kamtschatica* ⁽²⁶⁾

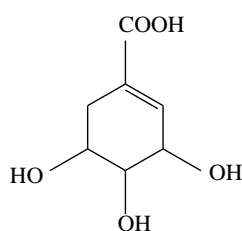
(9-cis,12-cis)-Linoleová kyselina (cis-9,cis-12-oktadekadienová kyselina)



Sloučenina izolována z pylu *A. sieboldiana* ⁽⁷⁵⁾

2.2.15 Prekurzor aromatických látek

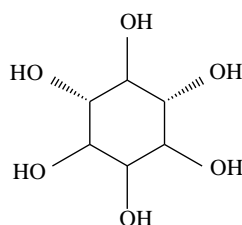
Šikimová kyselina (3,4,5-trihydroxycyklohex-1-en-1-karboxylová kyselina)



Sloučenina izolována z listů *A. formosana* ⁽³³⁾

2.2.16 Vitamíny

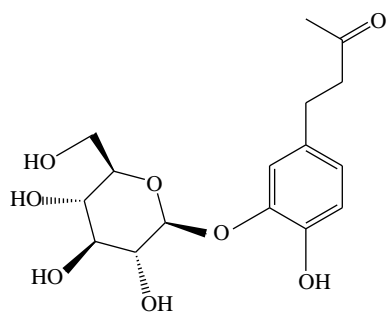
Inositol (hexahydroxycyklohexan)



Vitmin B₈ izolován z listů *A. formosana* ⁽³³⁾

2.2.17 Ostatní

Myzodendron (4-[3-(β -D-glukopyranosyloxy)-4-hydroxyphenyl]butan-2-on)



Sloučenina izolována z listů *A. formosana* ⁽³³⁾

2.3 Biologická aktivita

2.3.1 Přehled biologické aktivity látek rodu *Alnus*

sloučenina	biologická aktivita	výskyt
Alnicortol	-	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
Alnicortin	-	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
Alnusiin	inhibice lipolýzy indukované adrenalinem ⁽⁷⁶⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Alnusjaponin A	-	<i>A. japonica</i>
Alnusjaponin B	-	<i>A. japonica</i>
Alnusnin A	-	<i>A. sieboldiana</i>
Alnusnin B	-	<i>A. sieboldiana</i>
1,4-di-O-galloyl-β-D-glukosa	-	<i>A. japonica</i>
4,6-di-O-galloyl-β-D-glukosa	-	<i>A. japonica</i>
Flosin A	-	<i>A. japonica</i>
Stachyurin	antitumorová aktivita ⁽⁷⁷⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. sieboldiana</i>
1,2,6-tris-O-galloyl-β-D-glukosa	inhibiční účinek na aktivitu tyrosinazy v B16 myších buňkách melanomu ⁽⁷⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. sieboldiana</i>
1,4,6-tris-O-galloyl-β-D-glukosa	antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾	<i>A. hirsuta</i>
Stenofylanin A	antitumorová aktivita ⁽⁷⁷⁾	<i>A. sieboldiana</i>
5-O-β-D-(6'-O-galloyl)glukopyranosid kyseliny gentisové	-	<i>A. hirsuta</i>

2,3-O-(S)-hexahydroxydifenoyl-D-glukosa	inhibiční účinek na aktivitu tyrosinazy v B16 myších buňkách melanomu ⁽⁷⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. sieboldiana</i>
Tellimagrandin I	inhibice lipolýzy indukované adrenalinem ⁽⁷⁶⁾ , antitumorová aktivita ^(79, 80) , antibakteriální - účinnost proti <i>H. pylori</i> ⁽⁸¹⁾ , zesílení účinnosti β -laktamů proti metcilin-rezistentnímu <i>Staphylococcus aureus</i> ⁽⁸²⁾ , inhibiční účinek na chem. indukovanou diferenciaci lidských leukem. buněk ⁽⁸³⁾ , antivirotická aktivita ⁽⁸⁴⁾ , inhibitor karboanhydrázy ⁽⁸⁵⁾ , antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Casuarinin	antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾ , inhibice karboanhydrázy ⁽⁸⁵⁾ , aktivace makrofágů ⁽⁸⁶⁾ , inhibice produkce NO ⁽⁸⁷⁾ , antioxidační aktivita ^(88, 89) , indukce apoptózy ^(90, 91, 92) , antivirotická aktivita proti <i>H. simplex 2</i> ⁽⁹³⁾ , antitumorová aktivita ⁽⁹⁴⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Casuariin	antioxidační ⁽⁸⁸⁾ , antikoagulační ⁽⁹⁵⁾ , vasorelaxační, antihypertenzní účinek aktivita ⁽⁹⁶⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Gemin D	antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾	<i>A. japonica</i>
Hirsunin	-	<i>A. hirsuta</i>
Pedunculagin	inhibice aktivity tyrosinázy v B16 myších buňkách melanomu ⁽⁷⁾ , inhibice	<i>A. japonica</i> , <i>A. sieboldiana</i> , <i>A. hirsuta</i>

	adrenalinem indukované lipolýzy ⁽⁷⁶⁾ , antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾ , inhibice karboanhydrázy ⁽⁸⁵⁾ , aktivace makrofágů ⁽⁸⁶⁾ , inhibice produkce NO ⁽⁸⁷⁾ , antitumorová ^(94, 97, 98, 99) , antikoagulační ⁽⁹⁵⁾ , imunomodulační aktivita ⁽¹⁰⁰⁾	
4,6-(S)-Valoneoyl-D-glukopyranosa	-	<i>A. japonica</i>
Praecoxin A	antitumorová aktivita ^(101, 102, 103)	<i>A. japonica</i> , <i>A. hirsuta</i>
Rugosin F	-	<i>A. japonica</i> , <i>A. hirsuta</i>
1-degalloylrugosin F	-	<i>A. hirsuta</i>
Strictinin	antioxidační aktivita ⁽¹⁰⁴⁾ , inhibice produkce Il-4 (interleukinu-4) ⁽¹⁰⁵⁾ , antitumorová aktivita ⁽⁹⁴⁾	<i>A. siboldiana</i> , <i>A. japonica</i>
Alnincanon	-	<i>A. incana</i> , <i>A. maximowiczii</i> , <i>A. viridis</i>
Alnuselid	-	<i>A. serrulatoides</i>
Alnuserová kyselina	-	<i>A. serrulatoides</i>
Alnuserol	-	<i>A. serrulatoides</i>
Alnuserrutriol	-	<i>A. serrulatoides</i>
Alnuserrudiolon	-	<i>A. serrulatoides</i>
Alnustová kyselina	-	<i>A. japonica</i> , <i>A. sieboldiana</i> , <i>A. pendula</i>
12-deoxyalnustová kyselina	-	<i>A. pendula</i>
Alnusfoliendiolon	-	<i>A. glutinosa</i>
20,24-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28),25-dien-3-ová kyselina	-	<i>A. japonica</i>
20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-	-	<i>A. japonica</i>

3-ová kyselina		
Glutin-5-en-3-ol	-	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A. mandshurica</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. kamtschatica</i> ,
δ –Amyron	hepatoprotektivní účinek ⁽¹⁰⁶⁾	<i>Alnus spp.</i>
Lupeol	inhibice acylCoA cholesterol acyltransferázy ⁽¹⁰⁷⁾ , antitumorová aktivita ⁽²⁷⁾ , změna erytrocytární membrany a inhibice růstu Plasmodium falciparum ⁽¹⁰⁸⁾ , kardioprotektivní účinek u hypercholesterolemie ⁽¹⁰⁹⁾ , inhibice α-amylázy ⁽¹¹⁰⁾ , hepatoprotektivní účinek ⁽¹¹¹⁾ , antibakteriální, antifungální účinek ⁽¹¹²⁾ , antileishmaniozní účinek ⁽¹¹³⁾ , inhibice lipooxygenázy ⁽¹¹⁴⁾	<i>A. oregona</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. viridis</i> , <i>A. barbata</i> , <i>A. subcordata</i> , <i>A. nepalensis</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. formosana</i>
Lupenon	inhibice HIV-1 reverzní transkriptázy ⁽¹¹⁵⁾ , inhibice lipooxygenázy ⁽¹¹⁴⁾ , inhibiční účinek proti H. simplex 1, 2 ⁽¹¹⁶⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. formosana</i>
Betulin	inhibice acylCoA cholesterol acyltransferázy ⁽¹⁰⁷⁾ , antitumorová aktivita ⁽²⁷⁾ , změna erytrocytární membrany a inhibice růstu Plasmodium falciparum ⁽¹⁰⁸⁾ , antimalarický, antiHIV ⁽¹¹⁷⁾ , hepatoprotektivní ⁽¹¹⁸⁾	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. oregona</i> , <i>A. viridis</i> , <i>A. barbata</i> , <i>A. subcordata</i> , <i>A. nepalensis</i> , <i>A. maximowiczii</i> , <i>A. rubra</i>
3,4-secodammara-	-	<i>A. japonica</i>

4(28),20,24-trien-3,26-diová kyselina		
12,20,25-trihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-ová kyselina	-	<i>A. japonica</i>
20,25,26-trihydroxy-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-ová kyselina	-	<i>A. japonica</i>
Taraxerol	inhibice acetylcholinesterázy ⁽¹¹⁹⁾ , antiflogistický aktivita ⁽¹²⁰⁾	<i>Alnus spp.</i>
Taraxeron	-	<i>Alnus spp.</i>
β-Sitosterol	antifungální ^(112, 121) , antibakteriální ^(112, 122) , antihypercholesterolická ⁽¹²³⁾ , antihemolytická aktivita ⁽¹²²⁾ , inhibice agregace k. destiček ⁽¹²⁴⁾ , inhibice eukaryotické DNA polymerázy ⁽¹²⁵⁾ , imunomodulační aktivita ⁽¹²⁶⁾	<i>Alnus spp.</i>
β-Sitostanol	antihypercholesterolická aktivita ⁽¹²⁷⁾	<i>A. japonica, A. glutinosa</i>
Stigmastanon	deriváty-růstové stimulatory brambor ⁽¹²⁸⁾	<i>A. japonica, A. formosana</i>
Stigmast-4-en-3-on	hypoglykemická ⁽¹²⁹⁾ , vasodepresivní aktivita ⁽¹³⁰⁾ , inhibice Na ⁺ ,K ⁽⁺⁾ -ATPazy u benigní hyperplazii prostaty ⁽¹³¹⁾	<i>A. formosana</i>
Stigmastan-3,6-dion	-	<i>A. formosana</i>
Aldehyd 3-O-acetyloleanové kyseliny	-	<i>A. japonica, A. formosana</i>
Erythrodiol-3-acetát	cytotoxická aktivita ⁽¹³²⁾ , potenciální léčba/prevence stárnutí kůže ⁽¹³³⁾	<i>A. japonica</i>

Betulinová kyselina	změna erytrocytární membrany a inhibice růstu Plasmodium falciparum ⁽¹⁰⁸⁾ , inhibice diacylglycerolacyltransferázy ⁽¹³⁴⁾ , antitumorová, antiflogistická, antivirotická, antibakteriální, antiparazitická ⁽¹³⁵⁾ , hepatoprotektivní aktivita ⁽¹¹⁸⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. viridis</i> , <i>A. barbata</i> , <i>A. subcordata</i> , <i>A. nepalensis</i> , <i>A. maximowiczii</i>
Brassinolid	fytohormon ⁽¹³⁶⁾	<i>A. glutinosa</i>
Castasteron	fytohormon ⁽¹³⁶⁾	<i>A. glutinosa</i>
β -amyrin	Antiflogistická aktivita ⁽¹³⁷⁾	<i>A. japonica</i>
Hirsutanonol	inhibice produkce syntézy NO a prostaglandinu E2 ⁽¹³⁸⁾ , inhibice melanogenese ⁽¹³⁹⁾ , inhibice indukované exprese COX-2 ⁽¹⁴⁰⁾	<i>A. serrulatoidea</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. japonica</i>
Hirsutenon	chemopreventivní (chemoprotektivní) aktivita ⁽⁴²⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. hirsuta</i>
Oregonin	inhibice melanogenese ⁽¹³⁹⁾ , inhibice indukované exprese COX-2 ⁽¹⁴⁰⁾ , antitumorová ⁽¹⁴¹⁾ , antioxidační ^(142, 41) , antiflogistická ^(143, 144)	<i>A. rubra</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. formosana</i>
Oregonosid A	-	<i>A. rubra</i>
Oregonosid B	-	<i>A. rubra</i>
1,7-bis(4-hydroxyfenyl)hept-4-en-3-on	leishmanicidní ⁽¹⁴⁵⁾ , antioxidační a hepatoprotektivní aktivita ⁽¹⁴⁶⁾ , léčba nemoci způsobené <i>H. pylori</i> ⁽¹⁴⁷⁾	<i>A. rubra</i> , <i>A. japonica</i>
Alnuston	antibakteriální ⁽¹⁴⁸⁾ , antivirotická ⁽¹⁴⁹⁾ , antiemetická aktivita ⁽¹⁵⁰⁾	<i>A. pendula</i>
Yashabushidiol B	inhibice produkce NO v lipopolysacharidy aktivovaných	<i>A. sieboldiana</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A.</i>

	makrofázích ⁽¹⁵¹⁾	<i>mandshurica</i>
Yashabushidiol A	-	<i>A. sieboldiana</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A. mandshurica</i>
Dihydroyashabushiketol	antiemetická aktivita ⁽¹⁵²⁾ , inhibice 5 α -reduktázy ⁽¹⁵³⁾	<i>A. sieboldiana</i> , <i>A. firma</i>
Yashabushiketol	-	<i>A. sieboldiana</i> , <i>A. firma</i>
Yashabushitriol	-	<i>A. sieboldiana</i>
Yashabushiketodiol A	-	<i>A. sieboldiana</i>
1,7-difenylhept-4-en-3-on	antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁴⁾ , inhibice 5 α -reduktázy ⁽¹⁵³⁾	<i>A. maximowiczii</i>
Hannokinol	antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁵⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i>
Hirsutosid	-	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i>
Hannokinin	antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁶⁾	<i>A. japonica</i>
1,7-bis(4-hydroxyfenyl)hept-3-en-5-on	-	<i>A. japonica</i>
Alnusdiol	leishmanicidní aktivita ⁽¹⁴⁵⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. hirsuta</i>
7-(3,4-dihydroxy)-5-hydroxy-1-(4-hydroxyfenyl)hetan-3-on-5-O-β-D-xylopyranosid	antioxidační aktivita ⁽⁵³⁾	<i>A. japonica</i>
1-(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxy-7-(4-hydroxyfenyl)heptan-3-on-5-O-β-D-xylopyranosid	antioxidační aktivita ⁽⁵³⁾	<i>A. japonica</i>
1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-methoxyheptan-3-on	antioxidační aktivita ⁽⁵³⁾	<i>A. japonica</i>
1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxyheptan-3-on-5-O-[2-(2-methylbutenoyl)]-β-D-xylopyranosid	antioxidační ⁽⁵³⁾	<i>A. japonica</i>
(5R)-1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)heptan-5-ol	inhibice melanogenese ⁽¹³⁹⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i>

1,7-bis(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxyheptan-3-O-β-D-xylopyranosid	cytotoxická aktivita ⁽¹⁵⁷⁾	<i>A. japonica</i>
Rubranosid A	inhibice produkce syntézy NO a prostaglandinu E2 ⁽¹³⁸⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁸⁾ , inhibice melanogeneze ⁽²⁵²⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. japonica</i>
Rubranosid B	inhibice indukova syntézy NO ⁽¹⁵⁹⁾ , antioxidační aktivita ⁽⁵⁷⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. hirsuta</i>
Rubranosid C	antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁸⁾	<i>A. rubra</i> , <i>A. japonica</i>
Rubranosid D	inhibice syntézy NO a prostaglandinu E ⁽¹³⁸⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁸⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
Garugamblin-3	inhibice oxidace LDL ⁽⁵⁸⁾	<i>A. japonica</i>
Acerogenin L	inhibice oxidace LDL ⁽⁵⁸⁾ , inhibice farnesylproteintransferázy ⁽⁵⁸⁾	<i>A. japonica</i>
Acerosid VII	-	<i>A. formosana</i>
Kyselina hydroxyskořicová	antioxidační účinek na LDL ⁽¹⁶⁰⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁶¹⁾	<i>Alnus spp.</i>
Kyselina skořicová	inhibice exprese tkáňového faktoru inhibicí aktivace NF-κB (nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B-cells) ⁽¹⁶²⁾ , účinek na aktivitu telomerázy a diferenciaci buněk- antitumorová aktivita ⁽¹⁶³⁾ , snížení fertility ⁽¹⁶⁴⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁶⁵⁾	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. pendula</i> , <i>A. firma</i>
Kyselina ferulová	antioxidační a hypoglykemická aktivita ⁽¹⁶⁶⁾	<i>A. glutinosa</i>
Spermidinamid kyseliny hydroxyskořicové	-	<i>A. glutinosa</i>
Lyonisid	-	<i>A. glutinosa</i>

Secoisolaricirasinol-9,9'-diferulát	cytotoxická aktivita ⁽¹⁶⁷⁾	<i>A. japonica</i>
Eskuletin	imunomodulační ⁽¹⁶⁸⁾ , antibakteriální ⁽¹⁶⁹⁾ , antivirotická aktivita ⁽¹⁷⁰⁾ , inhibice degradace chrupavky ⁽¹⁷¹⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁷²⁾ , inhibice růstu leukemických buněk ⁽¹⁷³⁾ , hepatoprotektivní aktivita ⁽¹⁷⁴⁾	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	antiagregační ⁽¹⁷⁵⁾ , chemopreventivní ⁽¹⁷⁶⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁷⁷⁾	<i>Alnus spp.</i>
Šeříková kyselina	antioxidační aktivita ⁽¹⁷⁸⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
Vanilinová kyselina	antioxidační aktivita ⁽¹⁷⁸⁾ , inhibice α -glukosidázy ⁽¹⁷⁹⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. glutinosa</i>
Gallová kyselina	antileishmaniozní aktivita ⁽⁷⁸⁾ , slabý inhibitor karboanhydrázy ⁽⁸⁵⁾ , antioxidační ⁽⁸⁸⁾ , antiflogistická ⁽¹⁸⁰⁾ , antitumorová aktivita ⁽¹⁸¹⁾	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
5-O-galloyl(-)-šikimová kyselina	-	<i>A. japonica</i>
Ellagová kyselina	slabý inhibitor karboanhydrázy ⁽⁸⁵⁾ , antioxidační ^(88, 182) , antiproliferativní, antiaterogenní, esrogenní/antiestrogenní aktivita ⁽¹⁸³⁾	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
2,4-dihydroxybenzoová kyselina	antioxidační aktivita ⁽¹⁸⁴⁾	<i>A. formosana</i>
p-hydroxybenzoová kyselina	antioxidační aktivita ⁽¹⁸⁵⁾	<i>A. glutinosa</i>
3',5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavon	antibakteriální aktivita ⁽¹⁸⁶⁾	<i>A. japonica</i>
Kumatakenin	antimykobakteriální ⁽¹⁸⁷⁾ ,	<i>A. crispa</i> , <i>A. sinuata</i>

	antifungální aktivita ⁽¹⁸⁸⁾	
7,4'-dimethoxyluteolin	antioxidační aktivita ⁽¹⁵⁶⁾	<i>A. japonica</i>
Kempferid	antiestrogenní ⁽¹⁸⁹⁾ , antimutagenní aktivita ⁽¹⁹⁰⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. koehnei</i>
Rhamnazin	antibakteriální, antioxidační, antiflogisticky ⁽¹⁹¹⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. koehnei</i>
Kempferol	antiflogistická, antibakteriální aktivita ⁽¹⁹¹⁾ , inhibice 20α-HSD (hydroxysteroidní dehydrogenázy) ⁽¹⁹²⁾ , inhibice aktivačního faktoru krevních destiček ⁽¹⁹³⁾ , antioxidační aktivita ⁽¹⁹⁴⁾ , inhibice funkcí P- glykoproteinu a jeho exprese ⁽¹⁹⁵⁾ , neuroprotektivní účinek před beta amyloidem ⁽¹⁹⁶⁾ , inhibice lehkoreťezcové myosinkinázy ⁽¹⁹⁷⁾ , estrogenní aktivita ⁽¹⁹⁸⁾	<i>A. formosana</i> , <i>A.</i> <i>koehnei</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A.</i> <i>rubra</i> , <i>A. maximowiczii</i> , <i>A. hirsuta</i>
Rhamnetin	antitrypanozomální ⁽¹⁹⁹⁾ , antiflogistická aktivita ⁽²⁰⁰⁾ , inhibice mitochondriální respirace ⁽²⁰¹⁾	<i>A. koehnei</i> , <i>A. formosana</i>
Isorhamnetin	antioxidační ^(202, 203) , estrogenní ⁽¹⁹⁸⁾ , antimutagenní ⁽²⁰⁴⁾ , antiaterogenní aktivita ⁽²⁰⁵⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. koehnei</i>
Pinocembrin	antibakteriální ⁽¹⁴⁸⁾ , antivirotická ⁽¹⁴⁹⁾ , vasodilatační aktivita ⁽²⁰⁶⁾	<i>Alnus spp.</i>
5,7-dihydroxyflavon	kancerochemopreventivní aktivita ⁽²⁰⁷⁾ , inhibice proliferace indukce apoptózy v HeLa buňkách (buňky rakoviny děložního krčku) ⁽²⁰⁸⁾ ,	<i>A. sieboldiana</i>

	antitumorová ⁽²⁰⁹⁾ , protizánětlivá, antialergická ⁽²¹⁰⁾ , vasodilatační aktivita ⁽²⁰⁶⁾ , inhibice aktivace HIV ⁽²¹¹⁾	
Tectochrysin	antitumorová ⁽²¹²⁾ , antioxidační aktivita ⁽²¹³⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Strobopinin	imunomodulační aktivita ⁽²¹⁴⁾	<i>A. sieboldiana</i>
Betuletol	antitumorová aktivita ⁽²¹⁵⁾	<i>Alnus spp.</i>
3-methoxybetuletol	antikancerogenní aktivita ⁽²¹⁶⁾	<i>A. japonica, A. koehnei</i>
Centaureidin	stimulace exprese INF-gama (interferon-gama) ⁽²¹⁷⁾ , cytotoxická (antiproliferační) ⁽²¹⁸⁾ , antiflogistická ⁽²¹⁹⁾ , hypoglykemická aktivita ⁽²²⁰⁾	<i>A. koehnei</i>
Alnustinol	-	<i>A. pendula, A. sieboldiana</i>
Alnusin	-	<i>A. sieboldiana</i>
Alnustin	-	<i>A. sieboldiana</i>
3,5,8-trihydroxy-7-methoxyflavon	-	<i>A. sieboldiana</i>
Alnetin	-	<i>A. sieboldiana</i>
Rhamnocitrin	antiflogistická, antibakteriální aktivita ⁽¹⁹¹⁾	<i>Alnus spp.</i>
7,4'-dimethoxy-5-hydroxyflavon	inhibice α -glikosidázy ⁽²²¹⁾	<i>A. rubra</i>
Acacetin	inhibice cyklooxygenázy ⁽²²²⁾ , hypouremická aktivita (inhibice xanthinoxidázy ⁽²²³⁾ , indukce apoptózy u buněk karcinomu žaludku ⁽²²⁴⁾ , antioxidační ⁽²²⁵⁾ , vasodilatační ⁽²⁰⁶⁾ , antiplasmodialní aktivita ⁽²²⁶⁾ , inhibice aktivace HIV ⁽²¹¹⁾	<i>A. japonica a A. koehnei, A. rubra</i>

Apigenin	antiestrogenní ⁽¹⁸⁹⁾ , antibakteriální ⁽¹⁹¹⁾ , inhibice 20 α - HSD (hydroxysteroidní dehydrogenázy) ⁽¹⁹²⁾ , neuroprotektivní účinek před beta amyloidem ⁽¹⁹⁶⁾ , vasodilatační aktivita ⁽²⁰⁶⁾ , inhibice aktivace HIV ⁽²¹¹⁾	<i>A. rubra</i>
Pectolarigenin	insekticidní ⁽²²⁷⁾ , antitumorová (228)	<i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i>
Salvigenin	vasorelaxační aktivita ⁽²²⁹⁾	<i>A. rubra</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. koehnei</i>
Genkwanin	antiflogistický, antibakteriální ⁽¹⁹¹⁾ , antiplasmodialní ⁽²²⁶⁾ , antitumorová aktivita ⁽²³⁰⁾ , inhibice DNA topoisomerazy ⁽²³¹⁾ , antioxidační aktivita ⁽²³²⁾	<i>A. sinuata</i> , <i>A. glutinosa</i>
(-)-Epikatechin	inhibice DNA polymerázy a angiogeneze ⁽²³³⁾ , antimikrobiální, antimutagenní ⁽²³⁴⁾ , antioxidační aktivita ⁽²³⁵⁾	<i>A. hirsuta</i>
(+)-Katechin	antioxidační ⁽²³²⁾ , neuroprotektivní aktivita před toxicitou beta-amyloidu ⁽²³⁶⁾	<i>A. spp.</i>
Hyperosid	antioxidační ⁽²³⁷⁾ , kardioprotektivní ⁽²³⁸⁾ , protizánětlivá aktivita ⁽²³⁹⁾	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A. maximowiczii</i>
Myricetin-3-O-α-L-rhamnosid	antioxidační aktivita ⁽²⁴⁰⁾	<i>A. maximowiczii</i>
Kvercetin	inhibice 20 α -HSD (hydroxysteroidní dehydrogenázy) ⁽¹⁹²⁾ , inhibice funkcí P-glykoproteinu a jeho	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i> , <i>A. sibirica</i> , <i>A. hirsuta</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. rubra</i> , <i>A. formosana</i> ;

	exprese ⁽¹⁹⁵⁾ , antileishmanozní ⁽¹⁹⁹⁾ , estrogenní ⁽¹⁹⁸⁾ , antimutagenní aktivita	
Dihydrozeatin	-	<i>Alnus spp.</i>
1,4-dihydroxy-2,5,6-trimethoxyxanthon	-	<i>A. glutinosa</i>
4,6-dihydroxy-1,3-dimethoxyxanthon	-	<i>A. glutinosa</i>
2,3,4-trimethoxyfenanthren	-	<i>A. maximowiczii</i>
3,4-dihydroxy-5-methoxystilben	-	<i>A. viridis</i>
2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon	antitumorová ⁽²⁴¹⁾ , antibakteriální aktivita ⁽²⁴²⁾	<i>A. japonica</i> , <i>A. glutinosa</i>
Emodin	zvýšené vychytávání glukosy ⁽²⁴³⁾ , antioxidační ⁽²⁴⁴⁾ , insekticidní (na larvy komárů) ⁽²⁴⁵⁾ , antibakteriální ⁽²⁴⁶⁾ , antivirotická ⁽²⁴⁷⁾ , antitumorová aktivita ⁽²⁴⁸⁾	<i>A. glutinosa</i>
Heptakosan	-	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A. mandshurica</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. kamtschatica</i>
Tetrakosanol	-	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A. mandshurica</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. kamtschatica</i>
Trikosanol	-	<i>A. hirsuta</i> , <i>A. fruticosa</i> , <i>A. mandshurica</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. kamtschatica</i>
(9-cis,12-cis)-Linoleová kyselina	antiaterosklerotická aktivita ⁽²⁴⁹⁾ , ⁽²⁵⁰⁾	<i>A. sieboldiana</i>

Šikimová kyselina	analgetické, antipyretická, antiflogistická aktivita ⁽²⁵¹⁾	<i>A. formosana</i>
Inositol	antihyperglykemická aktivita (252)	<i>A. formosana</i>
Myzodendron	antibakteriální ⁽²⁵³⁾ , antioxidační aktivita ⁽²⁵⁴⁾	<i>A. formosana</i>

3. CÍL PRÁCE

Praktická část je zaměřena na fytochemickou studii a biologickou aktivitu kořene olše lepkavé (radix *Alnus glutinosa*). Olše lepkavá byla vybrána jako hojně rostoucí a lehce dostupný domácí zástupce rodu *Alnus* patřící do čeledi Betulaceae, ve které se vyskytují velice zajímavé látky. V poslední době byly často publikovány práce o izolaci a biologické aktivitě diarylheptanoidů (výskyt těchto látek byl potvrzen taky v jiných čeledích např. Zingiberaceae). Z hlediska fytochemického výzkumu a biologických aktivit patří kořeny olše k méně probádaným orgánům rostliny. Dosud nebyly publikovány práce o výskytu výše zmiňovaných diarylheptanoidů, které byly dříve prokázány v kůře, dřevu, listech, květech a plodech olše. Výskyt diarylheptanoidu oregoninu v kůře *Alnus glutinosa* naznačuje, že by mohl být prokázán výskyt oregoninu i v kořenech a tato problematika se stala náplní mé diplomové práce.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika zpracovaného materiálu

Analyzovaný vzorek tvořily kořeny *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. získané v říjnu roku 2005 z 2-4 m vysokých letorostů, které rostly na soukromém poli v Bohumíně. Kořeny byly sušeny týden při teplotě 37 °C, poté byly rozdrobněny drtičkou zahradního odpadu a finální rozdrobnění probíhalo na kulovém mlýně. Konečná hmotnost kořenů po úpravě činila 5,45 kg.

4.2 Použité chemikálie

Rozpouštědla

Methanol p.a.

Ethanol 96%

Aceton p.a.

Diethylether p.a.

Chloroform p.a.

Aqua destilata

Detekční činidla

1. ferrikyanid + ferrichlorid (směs ethanolických 3% roztoků chloridu železitého a hexakynoželezitanu draselného v poměru 1:1, obě složky se smísí před použitím a provede se nástřík)
2. vanilinové činidlo (směs 1% ethanolického roztoku vanilinu a 3% kyseliny chloristé v poměru 1:1, obě složky se smísí před použitím, po postřiku se chromatogram zahřívá při 105 °C do doby, než se vybarví skvrny)

4.3 Použité chromatografické adsorbenty

SILUFOL F 254

SILIKAGEL 60 F 254

SILIKAGEL (náplň do silikagelové kolony)

4.4 Použité přístroje

HPLC Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083

Roller

Horkovzdušná sušárna

Vaříč FISCHER SCIENTIFIC

Fén ETA 2313

Mixér Assistant M2600-600 W

Magnetické míchadlo MR 3001

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P

Mikrovýhřevný stolek BOETIUS

Vakuová odparka BÜCHI ROTAVAPOR R-114

Váhy předvážkové KERN 440-49N (max. 4000g, d=0,1 g), KERN 440-53 (max. 6000g, d=1g)

Analytické váhy AND HR-120 (max.120g, min. 10mg, d=0,1 mg, e=1mg)

4.5 Testovací silikagelová kolona

4.5.1 Úvodní chromatografické hodnocení komplexního extraktu pomocí TLC

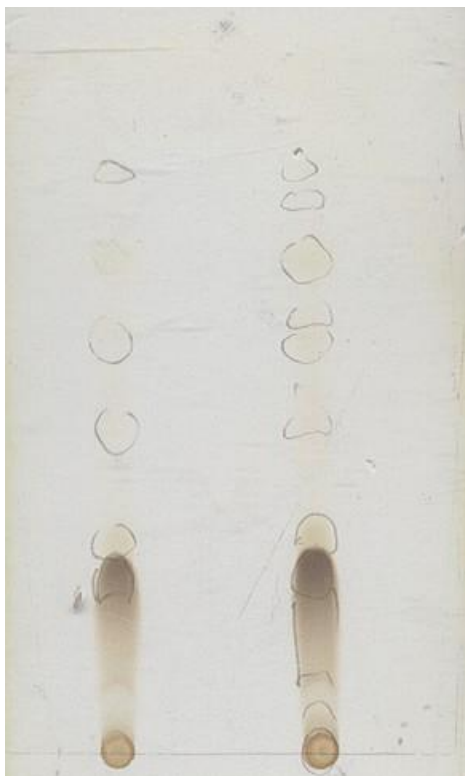
Příprava vzorku

Do kádinky bylo naváženo 50 g drogy, k rozdrcené droze bylo přidáno 500 ml roztoku aceton – voda 7:3 ⁽⁴⁶⁾, obsah kádinky byl přelit do mixeru, vířivá extrakce probíhala po dobu 10 min. Po ukončení extrakce byl extrakt přefiltrován přes skládaný filtrační papír a prolit 3 × 100 ml roztokem aceton-voda 7:3. Tento komplexní extrakt byl hodnocen tenkovrstvou chromatografií. Extrakt byl poté zahuštěn na vakuové odparce při teplotě 40 °C do sucha. Bylo získáno 2,327 g odparku.

Zhodnocení

Vyhodnocení souhrnného extraktu pomocí TLC je na chromatogramu č. 1, z různých zkoušených soustav byla soustava hexan-ethylacetát-methanol nejlepší.

Chromatogram č. 1



Adsorbent: SILUFOL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: UV

Počet vyvíjení: 1

Protože dělení původního extraktu podle článku Chen, J. et al.⁽⁴⁶⁾ se nedařilo, bylo přistoupeno k frakciování extraktu pomocí silikagelové kolony gradientovou elucí-zvyšováním podílu methanolu v chloroformu..

Příprava roztěru

Do kádinky bylo naváženo 7 g silikagelu, odparek z původního extraktu byl rozpuštěn v roztoku aceton-voda (7:3). Do odpařovací misky, která byla umístěna ve vodní lázni, se nasypalo odvážené množství silikagelu a přidal se původní extrakt. Vzniklá suspenze byla neustále promíchávaná zkumavkou až do úplného odpaření rozpouštědla při teplotě 50-60 °C. Část roztěru byla uchována na katedře botaniky jako kontrolní vzorek

Příprava kolony

Sorbent budoucí kolony tvořil silikagel s 12% vlhkostí, který byl dříve připraven Dr. Karličkovou. V kádince byla vytvořena suspenze chloroformu (100 g) a silikagelu s 12% vlhkostí (100 g). Takto vytvořená suspenze byla přelita do připravené kolony (2,5×39 cm, V=190 ml). Po usazení sloupce silikagelu byl opatrně na vrchol kolony aplikován dříve připravený roztěr a opatrně doléván chloroform. Roztěr byl překryt kruhem z filtračního papíru, filtr. papír zatížen drobnými skleněnými kuličkami.

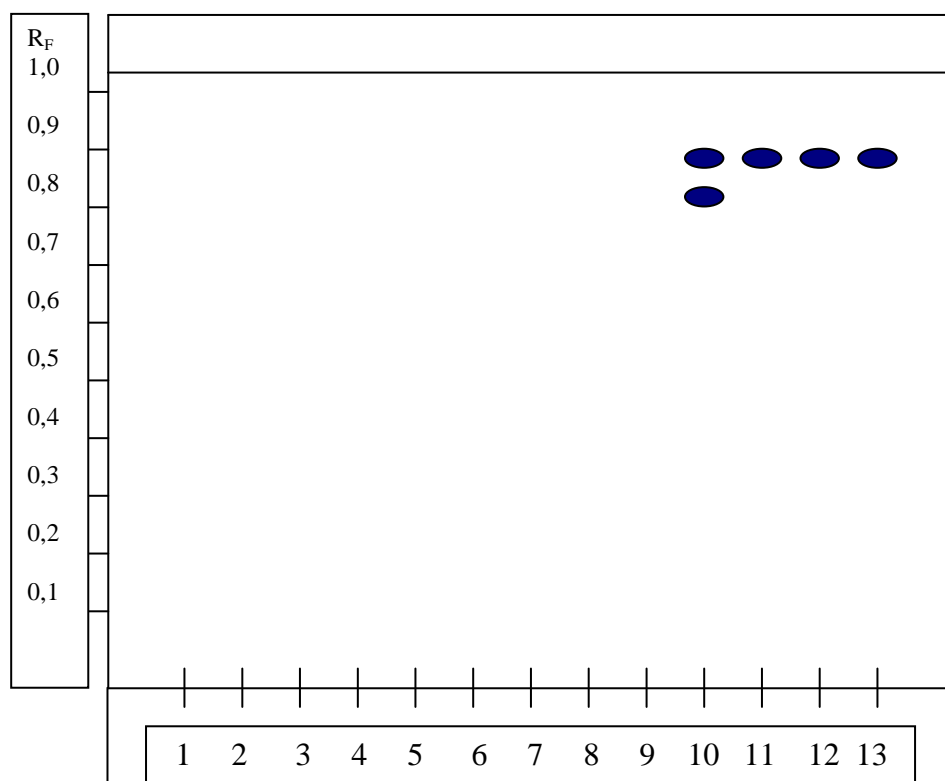
Gradientová eluce

Gradientová eluce probíhala zvyšováním obsahu methanolu v chloroformu (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 100 %), po eluci byla kolona vymyta 96% ethanolom. Jednotlivé frakce byly odebrány po cc 10 ml do zkumavek a změna rozpouštědla probíhala po 50 ml. Jednotlivé frakce byly následně zahuštěny na vakuové odparce při teplotě 40 °C a zředěny acetonem na 1-2 ml a vyhodnoceny pomocí TLC. Celkem bylo odebráno 36 frakcí.

Zhodnocení

Jednotlivé frakce původního extraktu z testovací silikagelové kolony jsou zachyceny na schématech chromatogramů č. 2, 3, 4., od frakce č. 17 se projevilo tzv. chvostování (vyznačeno světle modrou barvou), od frakce č. 20 velká část naneseného vzorku ulpívá na startu.

Schéma chromatogramu č. 2



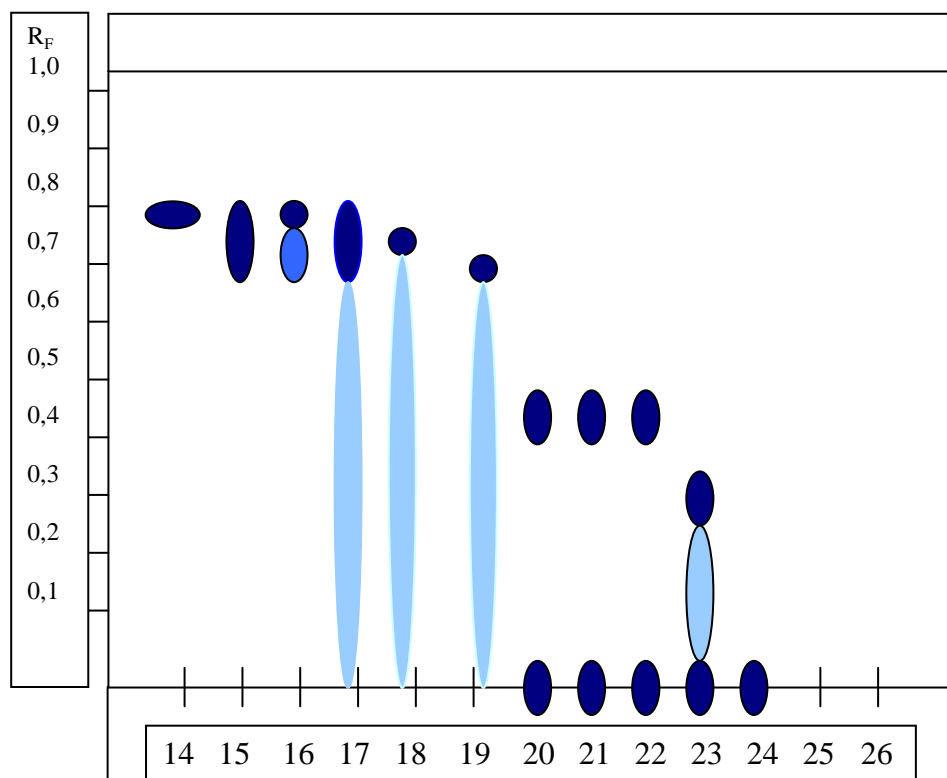
Adsorbent: SILUFOL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 3



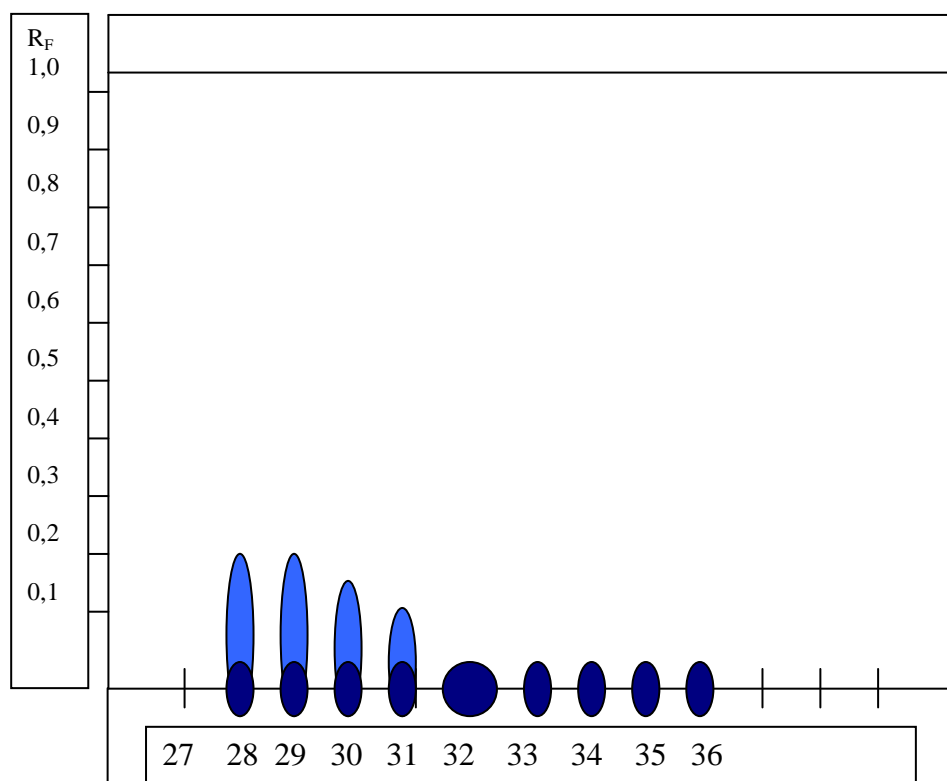
Adsorbent: SILUFOL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 4



Adsorbent: SILUFOL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

4.5.1.1 Frakce č. 7

Frakce č.7, které nereagovala s $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ činidlem, krystalizovala v podobě jehlic, byly dále identifikovány teplotou tání, TLC a GC-MS.

Měření teploty tání

Teplota tání byla změřena na mikrovýhřevném stolku BOETIUS. Výhřevnost byla nastavena tak, aby teplota do 100°C stoupala rychle a potom pomalu. Teplota tání byla stanovena v rozmezí $175\text{--}185^\circ\text{C}$ (neostrý přechod z tuhého stavu do kapalného). Teplota tání byla zkreslena obsahem nečistot, proto skutečná t.t. je zřejmě trochu jiná.

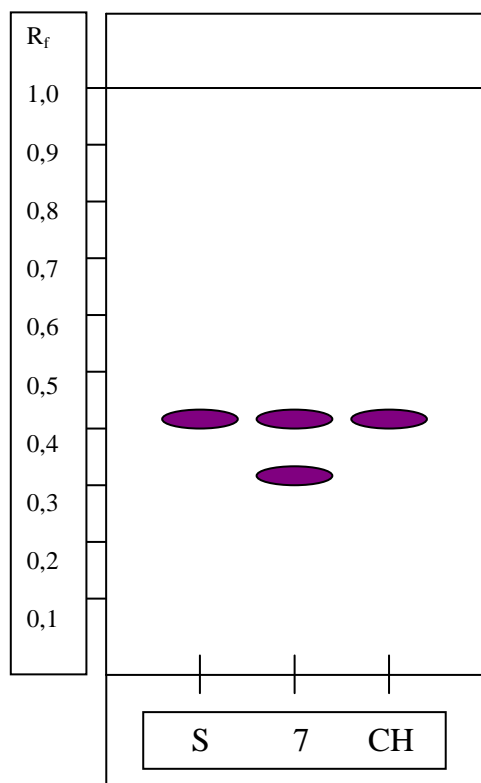
Detekce steroidů pomocí TLC

V databázi Dictionary of natural products on CD-ROM ⁽⁴⁸⁾ se t.t. obsahových látek v tomto rozmezí pohybovala u steroidních struktur. Porovnali jsme frakci č. 7 s dostupnými standardy steroidů na katedře - s cholesterolem a β -sitosterolem.

Zhodnocení

Frakce č. 7 byla nejprve vyvinuta se standardy cholesterolu a β -sitosterolu, retenční faktor cholesterolu, β -sitosterolu a jedné ze dvou skvrn frakce č. 7 se shodoval ($R_f = 0,43$), druhá skvrna frakce č. 7 měla retenční faktor 0,3 (schéma chromatogramu č. 5). Výskyt cholesterolu je v rostlinách vzácný, proto byla frakce č. 7 znovu vyvinuta společně s β -sitosterolem a to $4\times$, aby byl potvrzen výskyt β -sitosterolu v této frakci, retenční faktory se shodovaly ($R_f = 0,68$), u frakce č. 7 se opět objevila ještě jedna skvrna ($R_f = 0,58$), ve frakci se nachází zřejmě různé steroidy (chromatogram č. 6). Tato frakce byla poslána k dalšímu určení steroidů do fakultní nemocnice, detekce byla provedena v laboratořích klinické biochemie FN HK pomocí GC-MS.

Schéma chromatogramu č. 5



S= β -sitosterol, CH = cholesterol, 7= frakce č. 7

Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: chloroform-methanol (99:1)

Detekce: vanilinové činidlo

Počet vyvíjení: 1

Chromatogram č. 6



S = β -sitosterol, 7 = frakce č. 7, 7+S = frakce č. 7 + β -sitosterol

Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: 100% chloroform

Detekce: vanilinové činidlo

Počet vyvíjení: 4

Detekce steroidů pomocí GC-MS

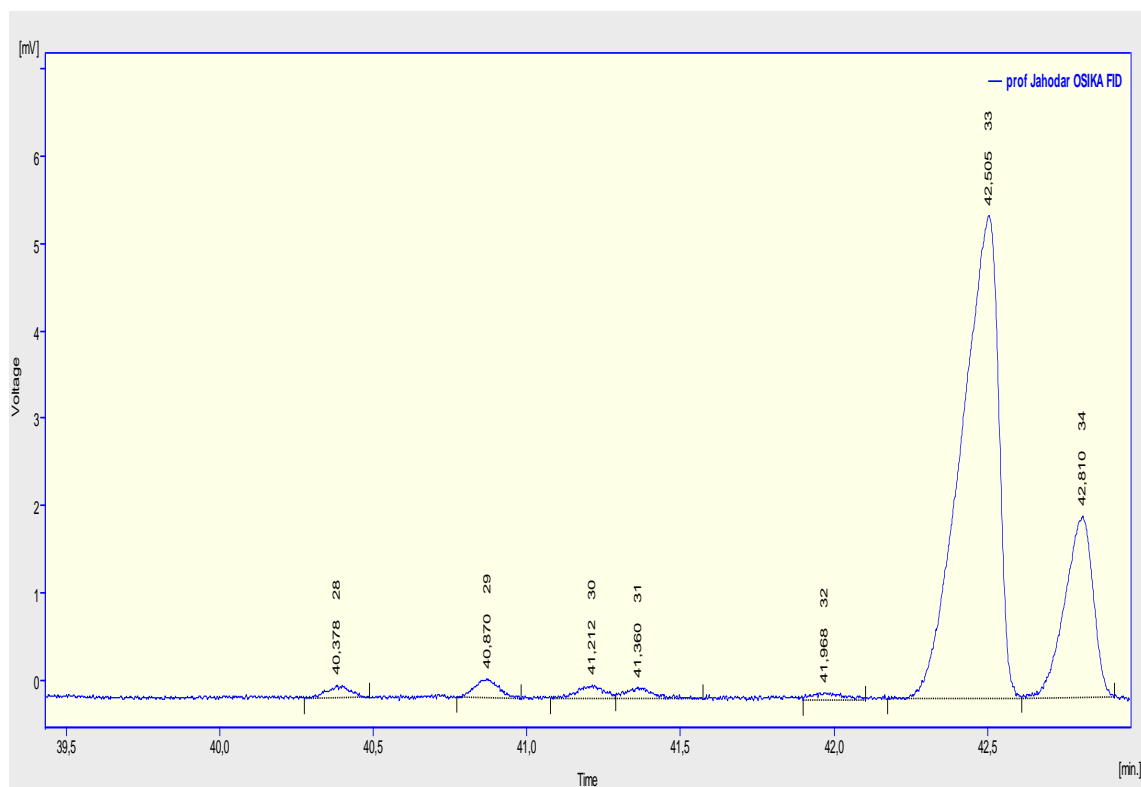
Měření bylo provedeno Dr. Hyšplerem ve fakultní nemocnici v Hradci Králové. Vzorek byl rozpuštěn v pyridinu a následně derivatizován BRTFA za vzniku trimethylsilyl etherů přítomných sterolů. Steroly byly identifikovány pomocí GC-MS (TurboMass, Perkin-Elmer) a jejich procentuální zastoupení bylo stanoveno pomocí plamenoionizačního detektoru (GC 8000, Fisons Instruments).

	Retenční čas	Plocha pod píkem	Procento zastoupení
Minoritní sterol	40,378	0,847	1,3
Minoritní sterol	40,87	1,263	1,94
Minoritní sterol	41,212	1,048	1,61
Minoritní sterol	41,36	1,034	1,59
Minoritní sterol	41,968	0,676	1,04
β -Sitosterol	42,505	46,829	71,86
β -Sitostanol	42,81	13,477	20,68
Suma		65,174	

Zhodnocení

Hlavní zastoupení ve frakci č. 7 měly steroidy β -Sitosterol (71,86%, retenční čas 42,505 min) a β -Sitostanol (20,68%, retenční čas 42,81 min), z minoritních steroidů měli největší procentuální zastoupení campesterol (1,94%, retenční čas 40,87 min), campestanol (1,61%, retenční čas 41,212) – viz záznam GC- MS č. 1.

Záznam GC - MS č. 1



4.5.1.2 Frakce č. 10, 19

Ve zkumavkách č. 10 a 19 se objevili drobné žluté krystalky, tyto dvě frakce byly podrobeny HPLC analýze.

HPLC analýza frakce č. 10, 19

Oba vzorky byly rozpuštěny v metanolu, nástřik 20 μ l, obě frakce byly stanovovány pomocí HPLC (Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083, kolona Merk, Purospher RP-18 endcapped, 5 μ m, 250 \times 4 mm, předkolona Tessek, SGX C18, CGC 30 \times 3 mm, 7 μ m) při vlnové délce 280 nm a průtoku 0,5 ml/min.

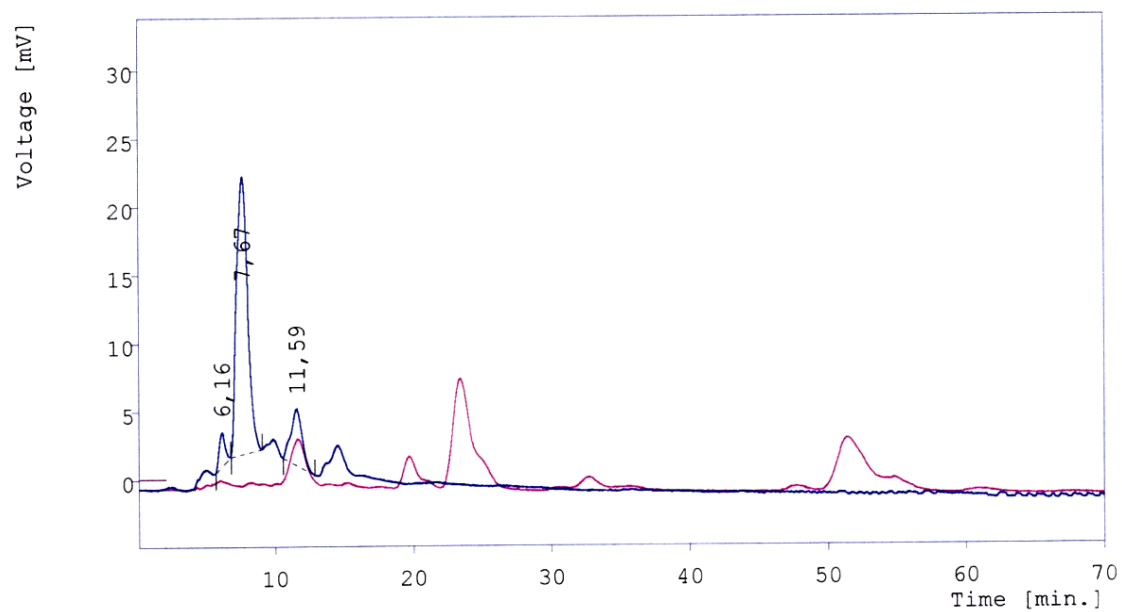
Fáze:

čas	methanol	voda
0 min	50%	50%
10 min	80%	20%
20 min	90%	10%
50 min	90%	10%

Zhodnocení

Na záznamu HPLC č. 1 je zachycen průběh č. 10,19. Frakce č.19-modrá barva, frakce č. 10- červená barva; hodnoty v tabulce jsem vztaženy na frakci č. 19.

Záznam HPLC č. 1



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	6,160	75,5633	2,466	0,540	5,167	9,131
2	7,673	1141,0897	20,357	0,933	78,033	75,385
3	11,593	245,6713	4,181	0,940	16,800	15,484
-	Total	1462,3243	27,004			

Stanovení antioxidační aktivity frakce č. 18 pomocí DPPH radikálu

Diarylheptanoidy se vyznačují antioxidační aktivitou ^(41, 142), takže potenciální diarylheptanoid ve frakci č. 19 (80% čistota) by vykazoval antioxidační aktivitu. Bylo to zvoleno jako jedno z možných řešení při hledání diarylheptanoidů, protože standard oregonin, vyskytující se v rodu *Alnus*, nebyl dostupný. Frakce č. 18 byla zvolena úmyslně-nedostatek množství frakce č. 19, předchází frakci č. 19 a je velká pravděpodobnost, že se v ní nachází majoritní látka z frakce č. 19. Měla být změřena taky frakce č. 11, ale velkým nedopatřením jsme o ni přišli.

Zjištění hmotnosti frakce č. 18

Obsah zkumavky byl rozpuštěn v 50% methanolu a kvantitativně přenesen do předem zvážené zkumavky, obsah zkumavky byl odpařen do sucha. Zjištěná hmotnost frakce :

$$\Delta m_{18} = 11,8344 - 11,8333 = 1,1 \text{ mg}$$

Stanovení antioxidační aktivity probíhalo podle návodu uvedeném v diplomové práci Petra Skály ⁽²⁵⁵⁾. Pro přípravu vodných roztoků byla použita vysoce čištěná voda. Připraveny byly tyto roztoky:

- 1) Ethanol 50%, který byl před použitím v SIA systému odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 5 min, roztok sloužil jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud.
- 2) Roztok DPPH v 50% ethanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100 ml odměrné baňce (k úplnému rozpuštění bylo třeba 5 min sonikace) a doplněn vodou na 100 ml. Po dalším 5 min odvzdušnění byla odměrná baňka zatemněna alobalem.
- 3) Měření frakce č. 18 byla rozpuštěna v 50 % ethanolu, tak, že vznikla koncentrace 0,5 mg/ml, roztok byl sonikován po dobu 1 min a důkladně protřepán, dále postupným ředěním byly připraveny nižší koncentrace.

Tímhle způsobem byly získány následující koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml. Spektrofotometricky byly stanoveny tyto hodnoty:

Tabulka antioxidační aktivity č. 1

Koncentrace (mg/ml)	Zhašení (%)
0,5	58,83
0,25	40,33
0,1	28,58

Zhodnocení

Výsledná EC_{50} = 0,32 mg/ml, pro porovnání několik antioxidačních standardů: kyselina askorbová EC_{50} = 0,006 mg/ml, trolox EC_{50} = 0,014 mg/ml (tabulka antiox. aktivity č. 1). Čím nižší hodnota EC_{50} , tím lepší antioxidant. Frakce č. 18 vykazovala slabou antioxidační aktivitu-hledaný diarylheptanoid v této frakci nebude.

4.6 Dělení na silikagelové koloně

Po předchozím úspěšném dělení na testovací silikagelové koloně padlo rozhodnutí, že vyzkoušíme frakcionání na větší silikagelové koloně, aby bylo získáno dostatečné množství látek potřebné k určení struktury a případně otestovat jednotlivé izolované látky na biologickou aktivitu.

Příprava vzorku

Do 4 kádinek bylo naváženo po 50 g (droga má velký objem, extrakce s 200 g najednou by v mixéru nebyla možná). Vířivá extrakce probíhala 4× po 50 g drogy s 600 ml rozpouštědla aceton-voda (7:3), filtrace hnědočerveného extraktu probíhala přes skládaný filtrační papír, každá filtrovaná část byla prolita 3×100 ml roztokem aceton-voda (7:3). Souhrnný extrakt byl odpařen do sucha na vakuové odparce při teplotě 40 °C, celkově bylo získáno 9,31 g odparku.

Příprava roztěru

Odparek (9,31 g) byl rozpuštěn v 250 ml roztoku aceton-voda (7:3), smíchán s naváženým množstvím silikagelu (20 g) a tato suspenze byla přenesena do odpařovací misky na vodní lázeň, odpařování rozpouštědla probíhalo při teplotě 50-60 °C.

Příprava kolony

Do kádinky o objemu 800 ml bylo naváženo 400 g silikagelu s obsahem 12% vody a 400 ml chloroformu, tato připravená suspenze byla opatrně přelita do kolony (4×50 cm). Po usazení sloupce silikagelu byl opatrně na vrchol kolony aplikován dříve připravený roztěr a opatrně doléván chloroform. Roztěr byl překryt kruhem z filtračního papíru, filtr. papír zatížen drobnými skleněnými kuličkami.

Gradientová eluce

Gradientová eluce probíhala podobně jako u testovací kolony-zvyšováním podílu ethanolu v chloroformu (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 50, 100 %), jednotlivé frakce nebyly odebrány po stejném objemu eluátu, ale podle barevného přechodu, celkem bylo najímáno 42 frakcí, zahuštěny na vakuové odparce na 2-3 ml při teplotě 40 °C.

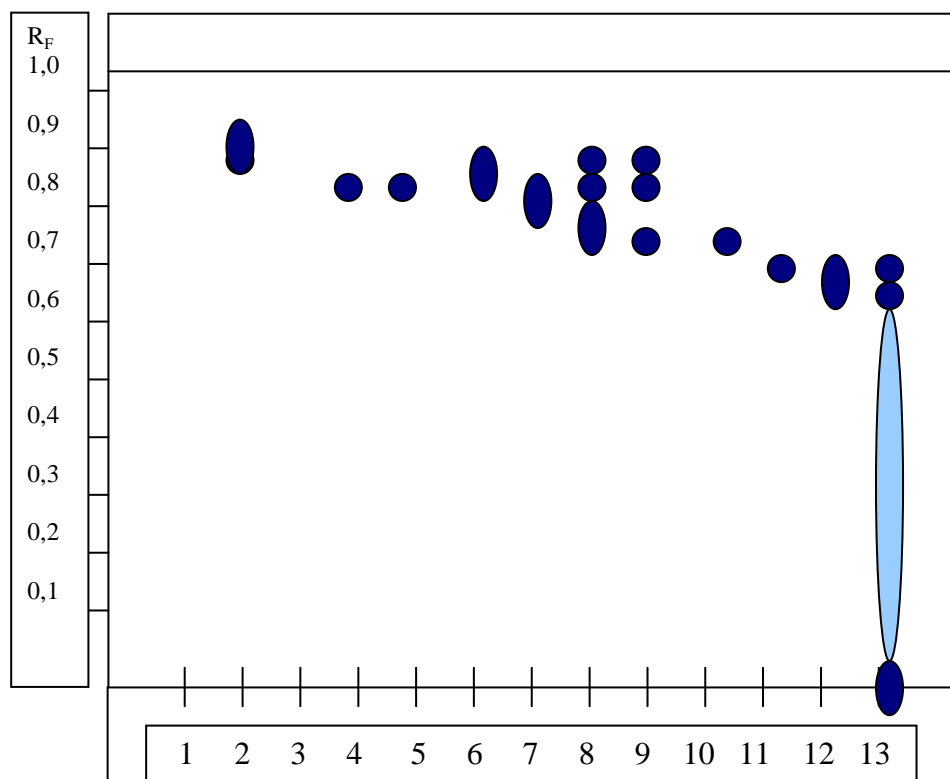
Číslo frakce	Objem (ml)	Eluční solvent
1	600	100% CHCl ₃
2	250	100% CHCl ₃
3	100	100% CHCl ₃
4	150	100% CHCl ₃
5	100	100% CHCl ₃
6	250	100% CHCl ₃
7	500	1% EtOH v CHCl ₃
8	250	2% EtOH v CHCl ₃
9	100	2% EtOH v CHCl ₃
10	250	2% EtOH v CHCl ₃
11	250	2% EtOH v CHCl ₃
12	500	4% EtOH v CHCl ₃
13	500	8% EtOH v CHCl ₃
14	500	8% EtOH v CHCl ₃
15	500	8% EtOH v CHCl ₃
16	500	8% EtOH v CHCl ₃
17	500	8% EtOH v CHCl ₃
18	500	8% EtOH v CHCl ₃
19	500	8% EtOH v CHCl ₃
20	1000	16% EtOH v CHCl ₃
21	1000	16% EtOH v CHCl ₃
22	1000	16% EtOH v CHCl ₃
23	1000	16% EtOH v CHCl ₃
24	1000	16% EtOH v CHCl ₃
25	1000	32% EtOH v CHCl ₃
26	1000	32% EtOH v CHCl ₃
27	1000	32% EtOH v CHCl ₃
28	1000	32% EtOH v CHCl ₃
29	1000	32% EtOH v CHCl ₃
30	1000	32% EtOH v CHCl ₃
31	1000	50% EtOH v CHCl ₃
32	1000	50% EtOH v CHCl ₃

33	1000	50% EtOH v CHCl ₃
34	1000	50% EtOH v CHCl ₃
35	1000	100% EtOH
36	500	100% EtOH
37	1000	100% EtOH
38	1000	100% EtOH
39	1000	100% EtOH
40	1000	100% EtOH
41	1000	100% EtOH
42	1000	100% EtOH

Zhodnocení

Jednotlivé jímané frakce byly vyhodnoceny ze zahuštěných vzorků pomocí TLC (schéma chromatogramů č. 9, 10, 11).

Schéma chromatogramu č. 9



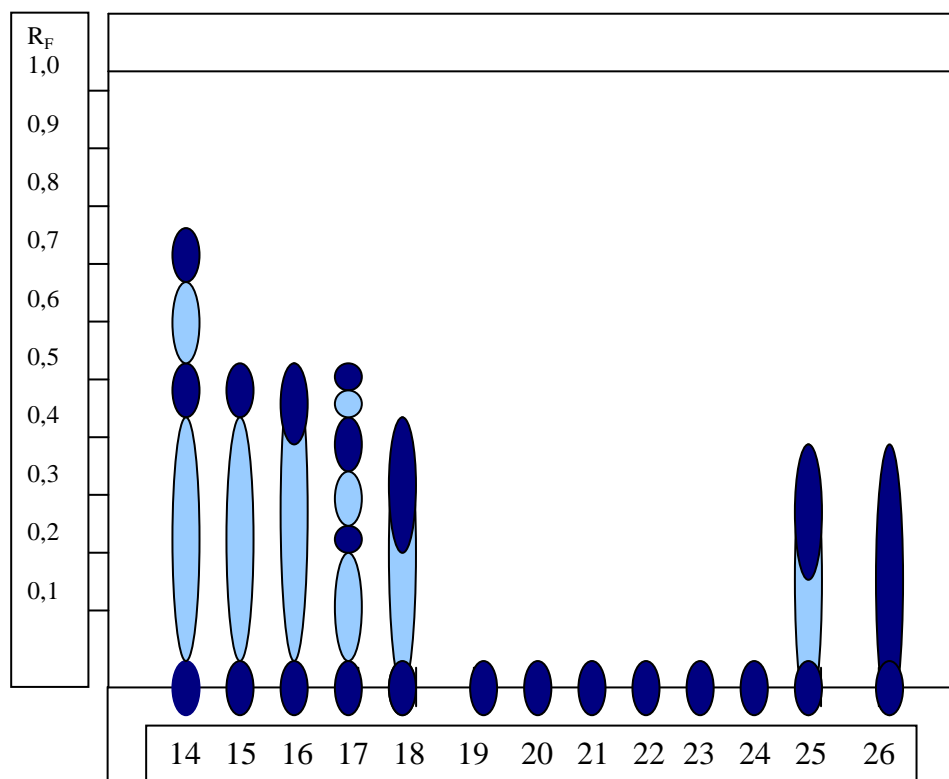
Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 10



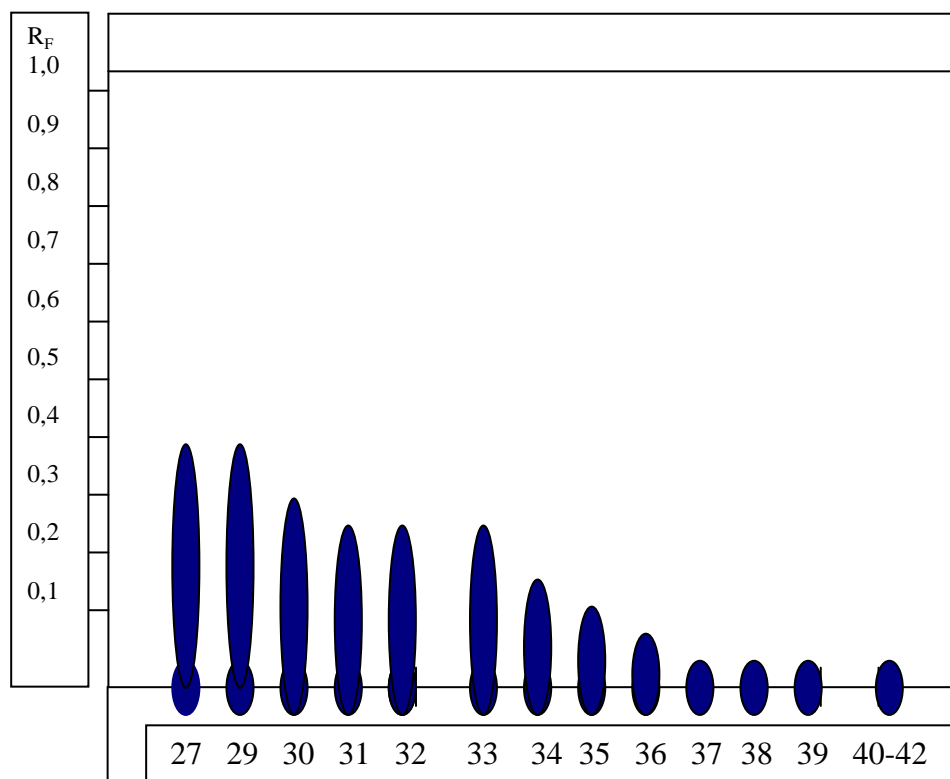
Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 11



Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

4.6.1 Vyhodnocení jednotlivých frakcí

Jednotlivé frakce byly uskladněny v lednici, zakryty hliníkovou fólií s dírkami, aby samovolným odpařováním rozpouštědla docházelo k vypadávání látek z roztoku. K vyhodnocení frakcí došlo za 6 měsíců (po absolvování šestiměsíční praxe). Ve frakci č. 5 se objevili žlutooranžové krystalky, frakce č. 6 měla nejen zajímavou vůni, ale i barvu (podobnou kari koření).

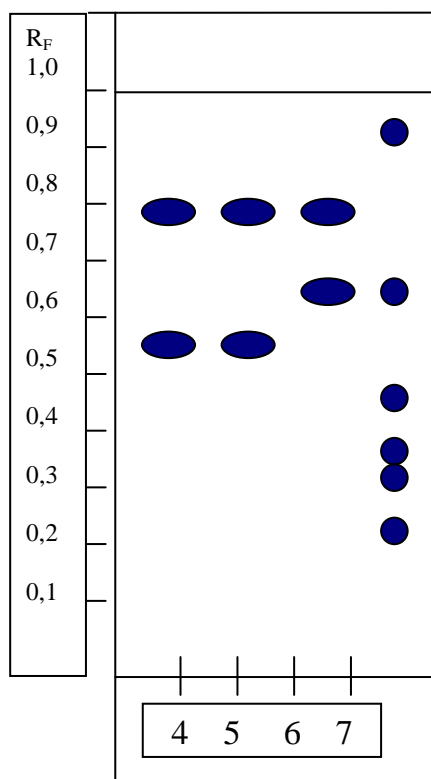
Příprava vzorků

Frakce č. 4-7 byly rozpuštěny v malém množství methanolu (3-5 ml) ve zkumavce a nanесeny kapilárkou na TLC desku, po zaschnutí skvrn byla tato deska vložena do komory, nechala se vyvíjet.

Zhodnocení

Retenční faktory ve frakcích č. 4 a 5 byly stejné, a proto byly tyto frakce spojeny dohromady (schéma chromatogramů č. 12, 13).

Schéma chromatogramu č. 12



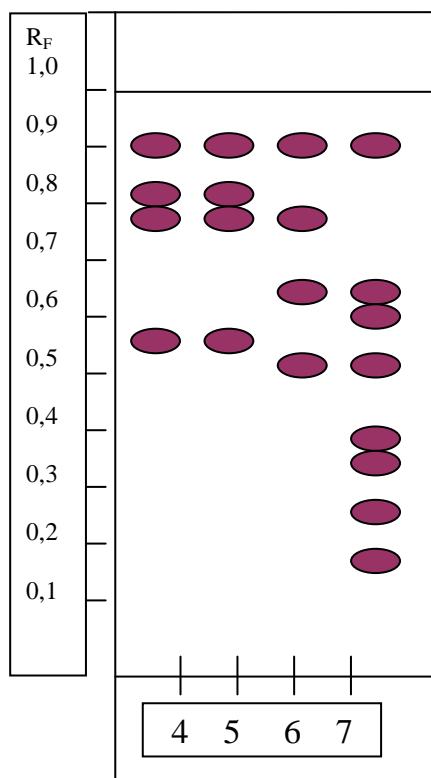
Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,3)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid, UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 13



Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,3)

Detekce: vanilinové činidlo

Počet vyvíjení: 1

4.6.1.1 Frakce č. 6

Množství frakce č. 6 bylo dostačující k dalšímu hodnocení, přečištění a určení struktury získané látky, eventuálně k otestování biologické aktivity. Zajímavá byla taky vůně (podobná kari koření).

Příprava vzorku

Z celkového množství frakce byl odebrán asi 1 mg a rozpuštěn ve zkumavce v 1 ml methanolu, tento roztok byl použit při TLC i HPLC analýze.

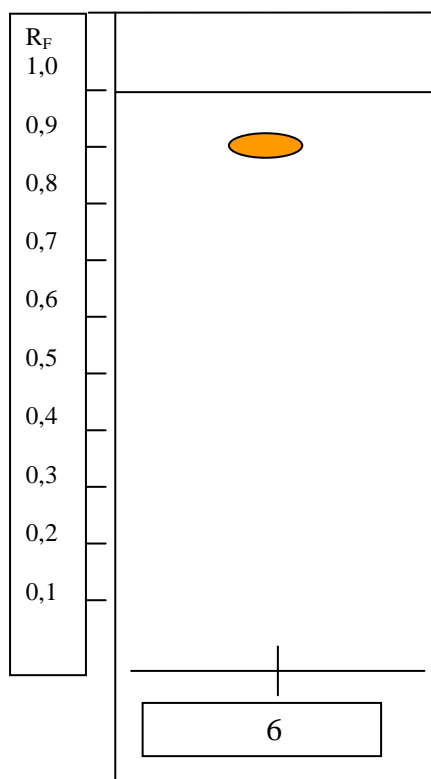
TLC

Frakce č. 6 byla nejprve hodnocena pomocí TLC, byla použita vždy stejná soustava hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1), ale detekce skvrn byla pokaždé jiná: nejprve pomocí UV, následovala detekce ferrikyanid + ferrichloridem, ve třetím vyvíjení vanilinovým činidlem (schéma chromatogramů č. 13, 14, 15).

Zhodnocení

Ve všech třech vyvíjeních při různé detekci byla vidět jen jedna skvrna, retenční faktor ($R_f = 0,92$) zůstal stále stejný (schéma chromatogramů č. 13, 14, 15).

Schéma chromatogramu č. 13



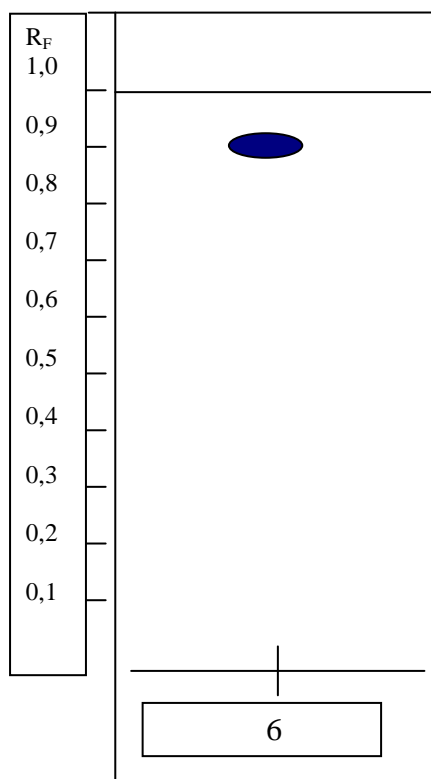
Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 14



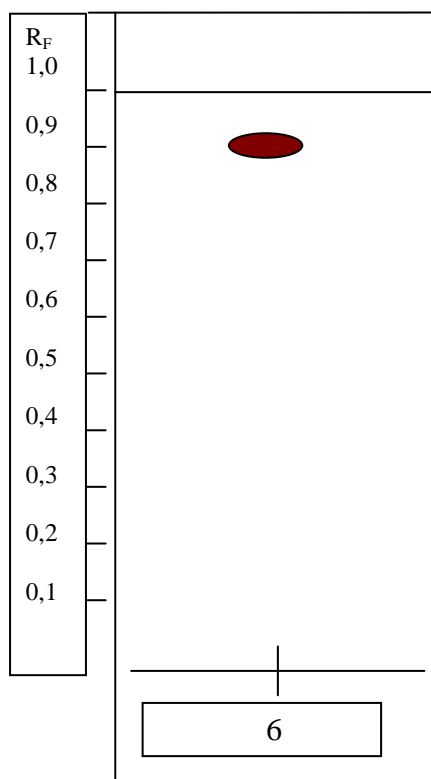
Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 15



Adsorbent: SILIKAGEL F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)

Detekce: vanilinové činidlo

Počet vyvíjení: 1

HPLC analýza frakce č. 6

Roztok frakce č. 6 z předchozí TLC byl použit i pro HPLC analýzu, standard diarylheptanoidu-kurkumin byl rozpuštěn v methanolu (koncentrace 7,9 mg/ml), nástřik obou vzorků 20 μ l, obě frakce byly stanovovány pomocí HPLC (Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083, kolona Merk, Purospher RP-18 endcapped, 5 μ m, 250 \times 4 mm, předkolona Tessek, SGX C18, CGC 30 \times 3 mm, 7 μ m) při vlnové délce 280 nm a průtoku 0,5 ml/min.

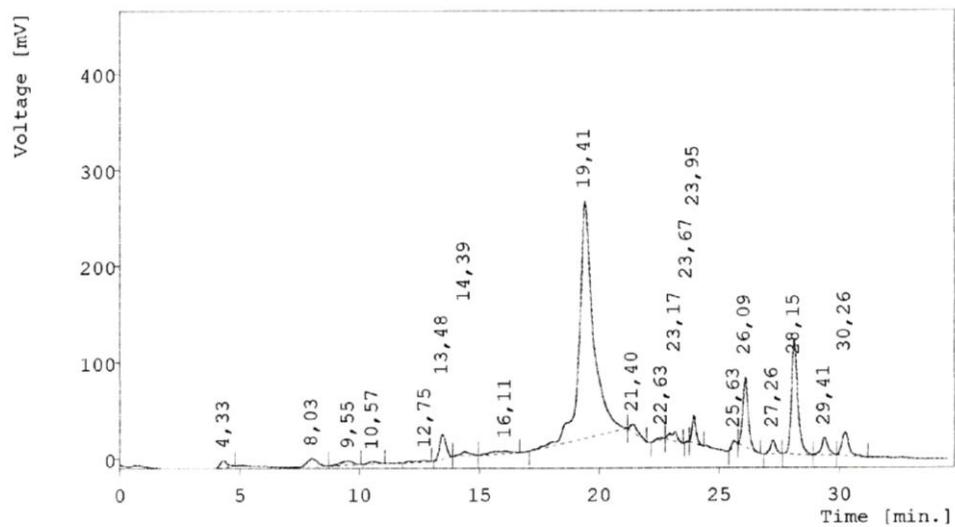
Fáze:

Čas	methanol	voda
0 min	50%	50%
10 min	80%	20%
20 min	90%	10%
50 min	90%	10%

Zhodnocení

Nejprve byl nasřiknut standard diarylheptanoidu kurkumin, hlavní pík kurkuminu vykazoval retenční čas 19,41 min (záznam HPLC č. 2), po kurkuminu došlo k nástřiku farkce č. 6, retenční čas hlavního píku vykazoval hodnotu 19,33 min. Srovnání průběhu záznamu obou analyzovaných vzorků je vidět na záznamu HPLC č. 3 (modrá barva píků odpovídá kurkumimu, červená barva píků odpovídá frakci č. 6). Zároveň byla u obou vzorků proměřena absorbance, kurkumin (schéma záznamu absorbance č. 1), frakce č. 6 v hlavním píku (schéma záznamu absorbance č. 2).

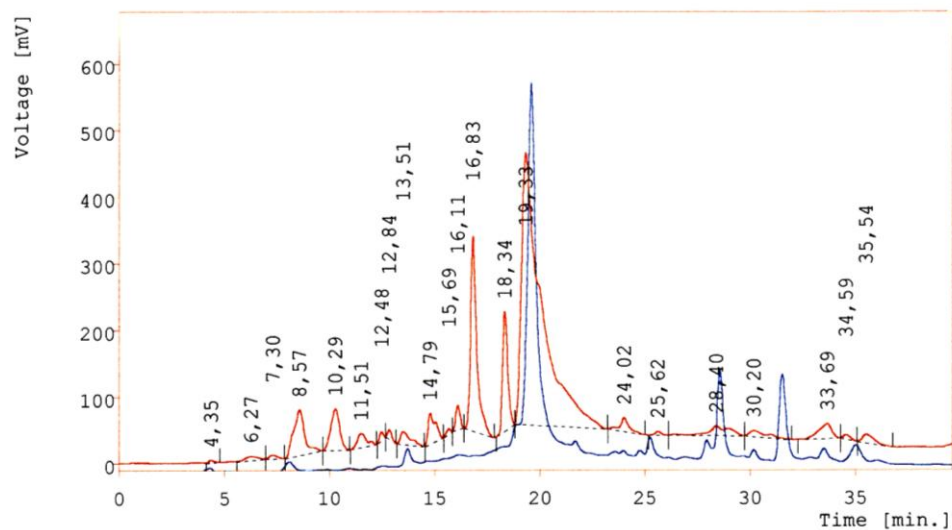
Záznam HPLC č. 2



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	4,333	144,2533	7,079	0,327	0,844	1,170
2	8,033	250,5465	8,163	0,493	1,466	1,349
3	9,553	154,0118	4,050	0,607	0,901	0,669
4	10,567	63,5436	2,310	0,467	0,372	0,382
5	12,753	66,0429	1,243	0,353	0,386	0,205
6	13,480	484,4558	25,432	0,313	2,834	4,202
7	14,393	126,4107	4,754	0,387	0,740	0,785
8	16,107	179,7371	2,695	1,047	1,051	0,445
9	19,413	10230,0212	246,384	0,500	59,846	40,706
10	21,400	182,8158	8,400	0,320	1,069	1,388
11	22,633	37,0550	1,358	0,273	0,217	0,224
12	23,173	196,4443	9,475	0,453	1,149	1,565
13	23,673	9,3967	1,456	0,113	0,055	0,241
14	23,953	354,9497	28,552	0,193	2,076	4,717
15	25,633	69,2537	6,139	0,227	0,405	1,014
16	26,093	1184,4478	72,299	0,247	6,929	11,945
17	27,260	238,0387	14,419	0,253	1,393	2,382
18	28,147	2230,7750	118,354	0,280	13,050	19,554
19	29,413	366,2980	18,464	0,287	2,143	3,051
20	30,260	525,5451	24,251	0,327	3,074	4,006
-	Total	17094,0425	605,277			

Záznam HPLC č. 3



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	4,353	59,9670	3,834	0,260	0,109	0,282
2	6,267	213,8814	5,599	0,720	0,387	0,413
3	7,300	138,4871	5,385	0,440	0,251	0,397
4	8,573	2526,3934	68,807	0,553	4,574	5,070
5	10,287	1873,1328	62,473	0,473	3,391	4,603
6	11,507	651,1880	21,279	0,447	1,179	1,568
7	12,480	155,2770	12,430	0,227	0,281	0,916
8	12,840	203,9237	14,565	0,227	0,369	1,073
9	13,507	622,0908	19,372	0,400	1,126	1,427
10	14,787	1132,4506	45,849	0,507	2,050	3,378
11	15,687	104,9538	7,498	0,213	0,190	0,552
12	16,107	527,4379	36,422	0,240	0,955	2,684
13	16,827	5970,7968	292,768	0,280	10,809	21,572
14	18,340	3008,8496	179,075	0,267	5,447	13,195
15	19,327	27310,5121	408,753	0,907	49,442	30,118
16	24,020	597,0199	20,773	0,327	1,081	1,531
17	25,620	112,8651	5,884	0,287	0,204	0,434
18	28,400	1003,4469	14,711	1,087	1,817	1,084
19	30,200	483,8655	8,916	0,593	0,876	0,657
20	33,693	977,3710	22,417	0,680	1,769	1,652
21	34,587	154,3980	6,745	0,360	0,280	0,497
22	35,540	471,0945	12,736	0,547	0,853	0,938
23	42,773	3911,1946	55,773	0,980	7,081	4,109
24	44,560	3027,2624	25,119	1,607	5,479	1,850
-	Total	55237,8600	1357,182			

Schéma záznamu absorbance č. 1

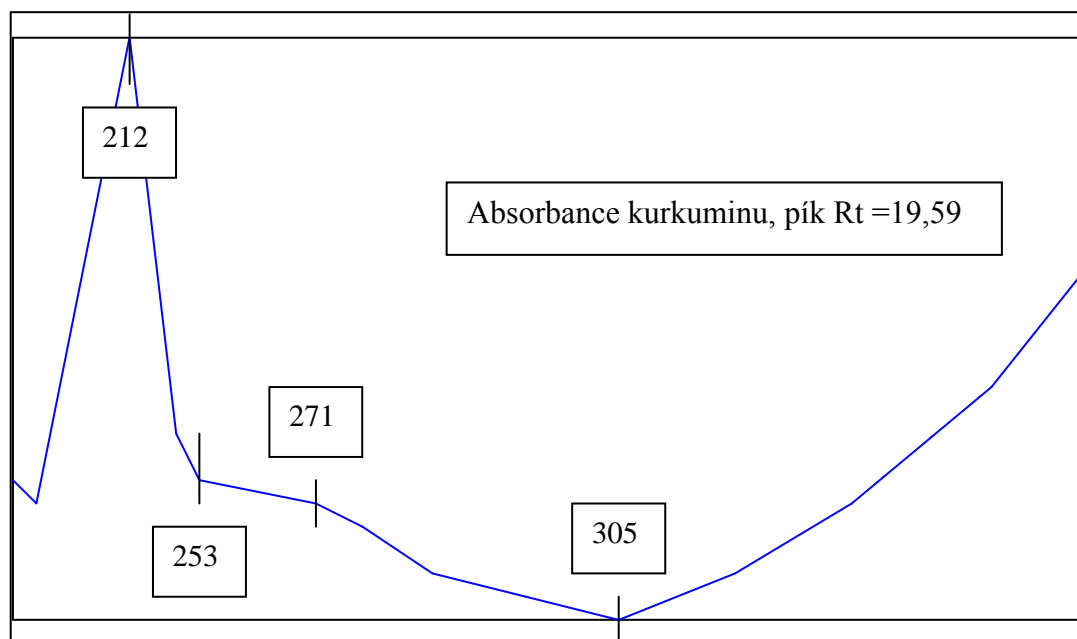
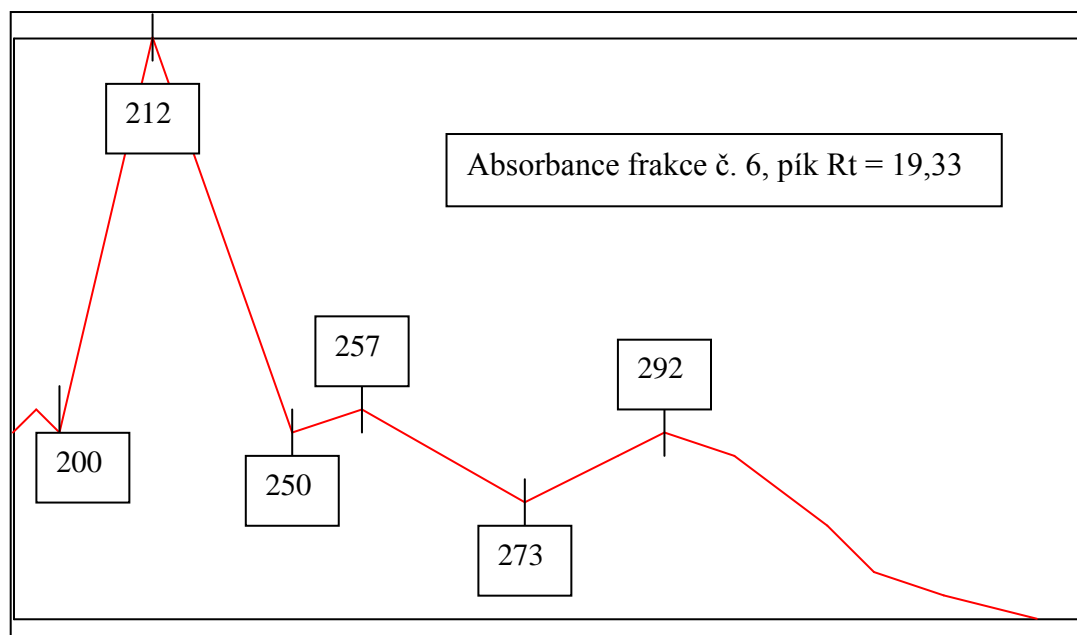


Schéma záznamu absorbance č. 2



4.6.1.1.1 Frakcionace frakce č. 6

Kvantitativní stanovení frakce č. 6

Před frakcionací a získání látky v hlavním píku ($R_t = 19,33$ min) bylo třeba zjistit množství této frakce. Ve zkumavce byla tato frakce rozpuštěna v 3 ml acetonu a kvantitativně přenesena do vytárované 10 ml srdcové baňky o hmotnosti 13,8944. Takto rozpuštěná frakce byla odpařena do sucha pod dusíkem.

$$\Delta m = m_{\text{vzorek+srdcovka}} - m_{\text{srdcovka}}$$

$$\Delta m = 14,0212 - 13,8944 = 126,7 \text{ mg}$$

Frakcionace

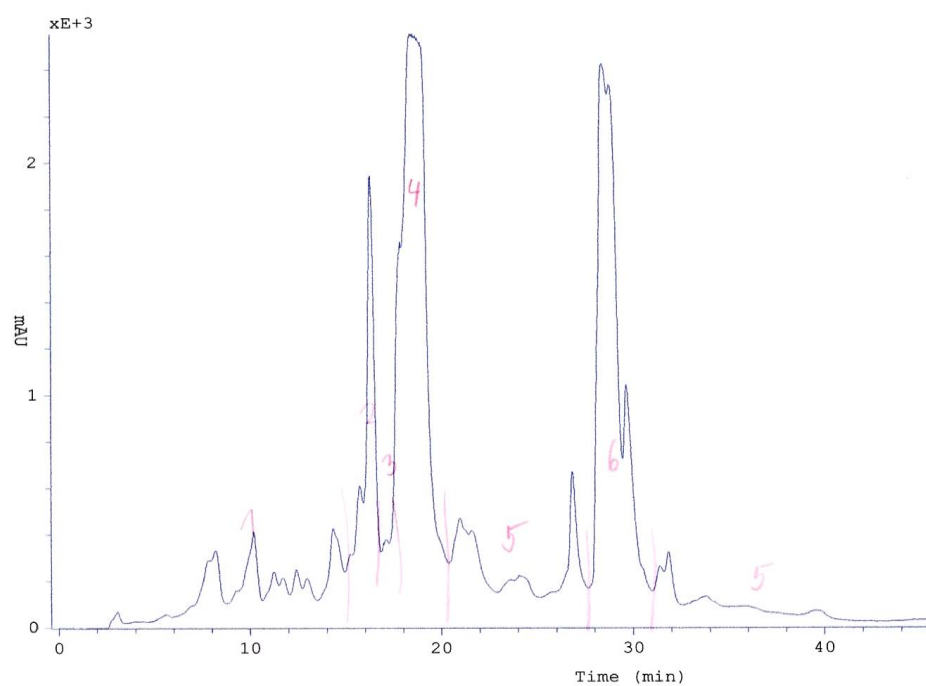
Část frakce (10,9 mg) byla uchována v lednici na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie jako kontrolní vzorek, zbytek byl rozpuštěn v methanolu, dělení frakce č. 6 probíhalo pomocí HPLC (Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083, kolona Merk, Purospher RP-18 endcapped, 5 μm , 250×4 mm, předkolona Tessek, SGX C18, CGC 30×3 mm, 7 μm) při vlnové délce 280 nm, fáze:

čas	methanol	voda
0 min	50%	50%
10 min	80%	20%
20 min	90%	10%
50 min	90%	10%

Zhodnocení

Při dělení frakce bylo získáno celkem 6 podfrakcí, podfrakce č. 4 odpovídá hlavnímu píku ($R_t = 19,33$). Jednotlivé úseky, které odpovídají jednotlivým podfrakcím jsou znázorněny na záznamu HPLC č. 4.

Záznam HPLC č. 4



Zjištění hmotností jednotlivých podfrakcí

Jednotlivé podfrakce byly zahuštěny na vakuové odparce a přeneseny kvantitativně do předem vytárovaných 100 ml dest. baněk.

Hmotnost jednotlivých podfrakcí: $m_1 = 5,7$ mg
 $m_2 = 3,9$ mg
 $m_3 = 14,5$ mg
 $m_4 = 13,7$ mg
 $m_5 = 34,3$ mg
 $m_6 = 8,5$ mg

Součet všech podfrakcí č. 1-6 (80,6 mg) vypovídá, že došlo při frakcionaci, nebo zahušťování na vakuové odparce k velkým ztrátám.

Vyhodnocení dělení jednotlivých podfrakcí č.1-6

TLC

Podfrakce č. 1-6 byly rozpuštěny v 3 ml acetonu, nanесeny kapilárou na SILIKAGEL 60 F 254, vyvíjeny v soustavě hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,5), detegovány vanilinovým činidlem.

HPLC

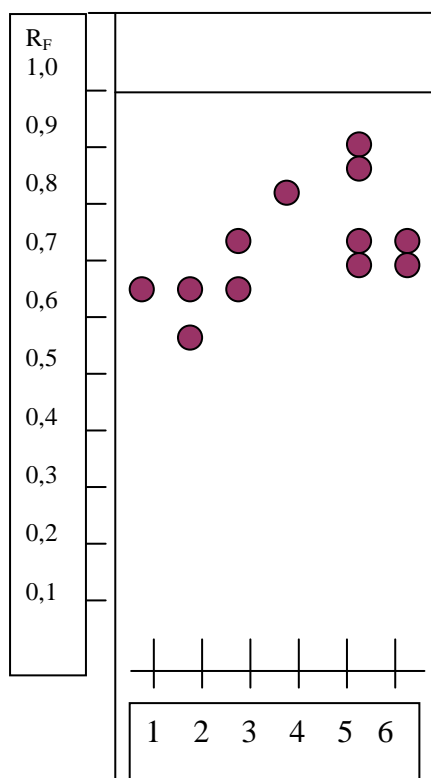
Podfrakce č. 4 obsahující hlavní pík ($R_t = 19,33$ min) byla po preparaci vyhodnocena na HPLC.), nástřik vzorku 20 μ l, přístroj HPLC (Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083, kolona Merk, Purospher RP-18 endcapped, 5 μ m, 250 \times 4 mm, předkolona Tessek, SGX C18, CGC 30 \times 3 mm, 7 μ m) při vlnové délce 280 nm a průtoku 0,5 ml/min, fáze:

čas	Methanol	voda
0 min	50%	50%
10 min	80%	20%
20 min	90%	10%
50 min	90%	10%

Zhodnocení

Na TLC schématu chromatogramu č. 19 je vidět, že k rozdělení původní frakce č. 6 na podfrakce č. 1-6 došlo, záznam HPLC č. 5 ukazuje průběh, čistotu přečištěné podfrakce č. 4, k přečištění podfrakce č. 4 došlo, ale ne úplně (hlavní pík má jen 77,6 % zastoupení).

Schéma chromatogramu č. 19



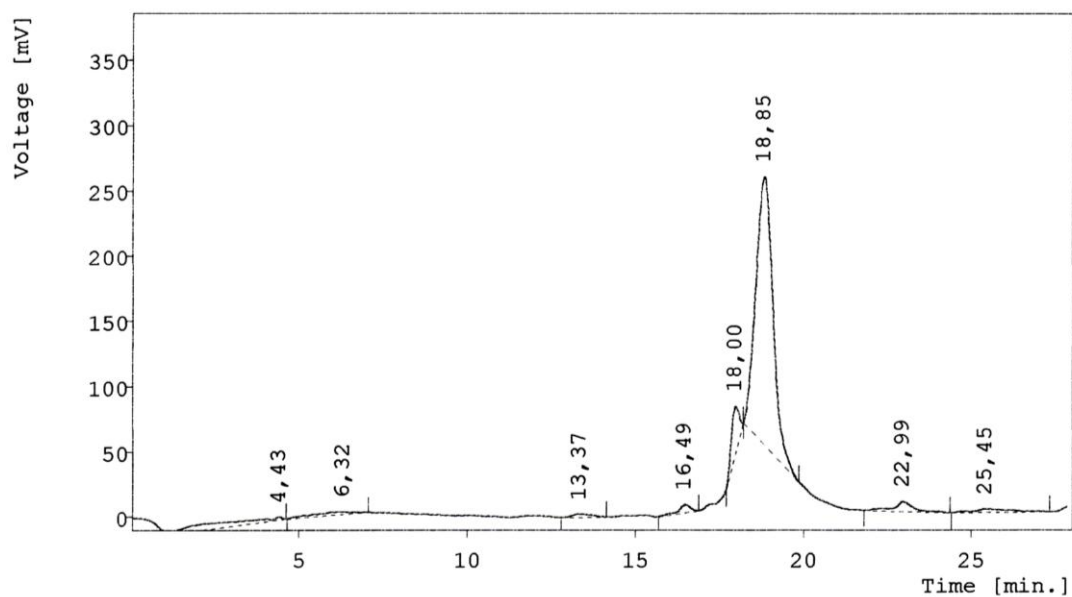
Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,5)

Detekce: vanilinové činidlo

Počet vyvíjení:

Záznam HPLC č. 5



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	4,427	579,1950	2,086	0,220	6,057	0,791
2	6,320	186,8647	1,873	1,207	1,954	0,710
3	13,367	101,1268	2,406	0,753	1,057	0,912
4	16,493	145,6599	6,002	0,353	1,523	2,275
5	18,000	545,7367	34,054	0,320	5,707	12,906
6	18,847	7421,1794	206,816	0,567	77,603	78,380
7	22,987	339,9906	7,750	0,447	3,555	2,937
8	25,453	243,2681	2,876	1,320	2,544	1,089
-	Total	9563,0213	263,863			

Závěr

Identifikace látky (pík č. 6) probíhá v laboratořích klinické biochemie FN HK.

4.7 Etherová frakce komplexního extraktu

Při HPLC separaci a následném odpaření do sucha na vakuové odparce došlo u frakce č. 6 k velkým hmotnostním ztrátám, proto byla vyzkoušena zrychlená šetrná metoda dělení-extrakce souhrnného extraktu do diethyletheru a zahuštění etherové vrstvy pod dusíkem. Tato metoda byla vyzkoušena jako další možnost dostat se k diarylheptanoidům.

Příprava vzorku

Do kádinky bylo naváženo 30,1 g drogy, k navážce se přidalo 300 ml roztoku aceton-voda (7:3). Vířivá extrakce probíhala na magnetické míchačce po dobu 1 hodiny při otáčkách 1000 ot/min. Komplexní extrakt byl získán přefiltrováním přes skládaný filtrační papír. Získaný extrakt byl zbaven acetonu probubláváním pod dusíkem. Při odpařování acetonu docházelo k vypadávání látek z roztoku, bylo získáno asi 50 ml vodné suspenze.

Vytřepání lipofilní částí extraktu do diethyletheru

Vytřepávání 50 ml vodné suspenze s etherem probíhalo v poměru 1:1 v 250 ml dělicí nálevce. Tento postup se opakoval 3× a jednotlivé etherové vrstvy byly spojeny dohromady (200 ml). Zbavení možných hydrofilních látek v etherové fázi probíhalo v 500 ml dělicí nálevce opačným postupem - vytřepáním spojené etherové fáze (200 ml) s vodou v poměru 1:1, opět 3×. Při vytřepávání spojené etherové vrstvy s vodou docházelo k silnému pění a vytvoření mezifáze. Etherová vrstva byla zbavena vody přefiltrováním přes filtrační papír, který byl naplněn uhlíčitánem draselným. Po odpaření diethyletheru pod dusíkem bylo získáno 13,2 mg. Etherová frakce byla podrobena TLC i HPLC analýze.

4.7.1 TLC

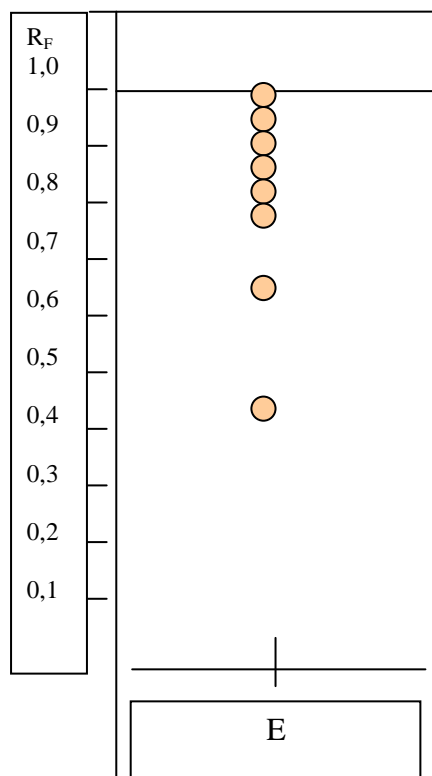
Ještě před odpařením do sucha a zjištění hmotnosti etherového výtřepku, byla tato frakce monitorována pomocí TLC.

Zhodnocení

Komplexní etherová frakce byla vyhodnocena nejprve vizuálně pod UV lampou (schéma chromatogramu č. 21). Srovnání etherové frakce s přečištěnou podfrakcí č. 4

z původní frakce č. 6, která byla získána při dělení na silikagelové koloně, nejprve s UV detekcí (schéma chromatogramu č. 22); s ferrikyanid+ferrichloridem (schéma chromatogramu č. 23). Schémata chromatogramů č. 22, 23 naznačují, že v etherovém výtřepku se nachází látky s podobným retenčním faktorem ($R_f = 0,9$) jako u podfrakce č. 4.

Schéma chromatogramu č. 21



E = etherový komplexní extrakt

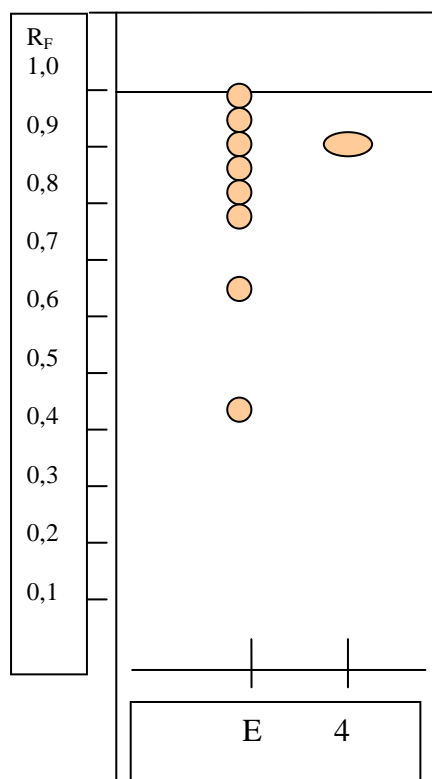
Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,5)

Detekce: UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 22



E = etherový komplexní extrakt, 4 = podfrakce č. 4 získána frakcionací frakce č. 6

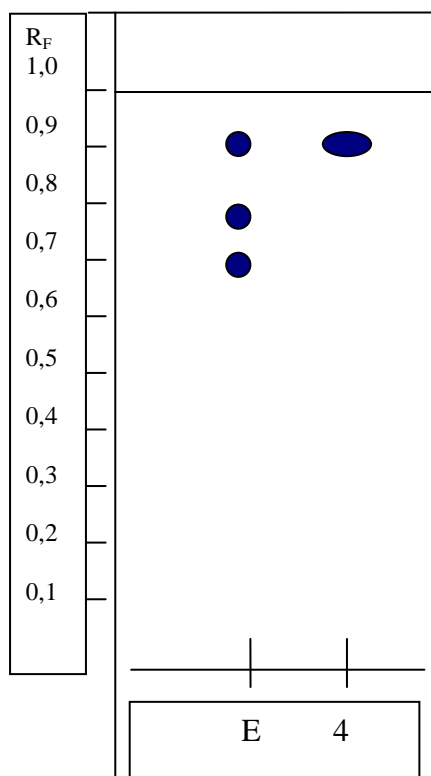
Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,5)

Detekce: UV

Počet vyvíjení: 1

Schéma chromatogramu č. 23



E = etherový komplexní extrakt, 4 = podfrakce č. 4 získána frakcionací frakce č. 6

Adsorbent: SILIKAGEL 60 F 254

Soustava: hexan-ethylacetát-methanol (2:2:0,5)

Detekce: ferrikyanid + ferrichlorid

Počet vyvíjení: 1

4.7.2 HPLC

Příprava vzorku

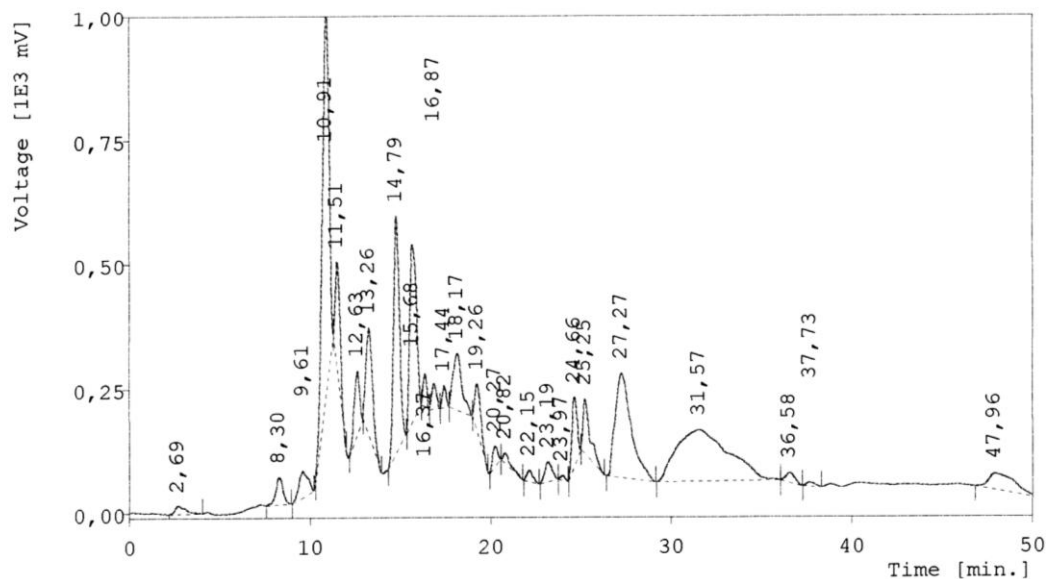
Etherový byl rozpuštěn v methanolu, vznikl roztok o koncentraci 13,2 mg/ml. Nástřik vzorku na kolonu: 20 µl, analýza probíhala na HPLC (Philips PU4100, detektor ECOM LCD 2083, kolona Merk, Purospher RP-18 endcapped, 5 µm, 250×4 mm, předkolona Tessek, SGX C18, CGC 30×3 mm, 7 µm) při vlnové délce 280 nm a průtoku 0,5 ml/min, fáze:

Čas	methanol	voda
0 min	50%	50%
10 min	80%	20%
20 min	90%	10%
50 min	90%	10%

Zhodnocení

Látky v etherovém výtřepku z komplexního extraktu vykazují podobné retenční časy jako u frakce č. 6 z velké kolony, ale poměry zastoupení jednotlivých látek jsou jiné, píky kolem 20. minuty jsou potlačené, naopak píky mezi 10 – 15 min jsou ve větším procentuálním zastoupením (záznam HPLC č. 6).

Záznam HPLC č. 6



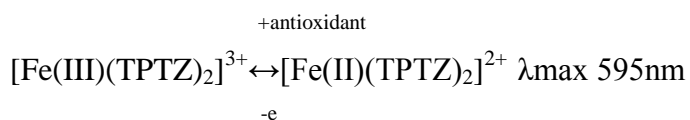
Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	2,687	680,7183	16,829	0,660	0,607	0,491
2	8,300	1562,6183	55,219	0,433	1,392	1,610
3	9,607	1823,7307	52,007	0,667	1,625	1,516
4	10,907	19925,0083	780,714	0,407	17,753	22,764
5	11,507	4343,3764	219,461	0,307	3,870	6,399
6	12,633	2624,9464	123,752	0,340	2,339	3,608
7	13,260	5757,8461	220,145	0,413	5,130	6,419
8	14,793	10884,3927	476,578	0,367	9,698	13,896
9	15,680	9163,4865	358,216	0,453	8,164	10,445
10	16,373	921,5648	67,143	0,240	0,821	1,958
11	16,867	949,7924	50,215	0,327	0,846	1,464
12	17,440	639,1108	43,839	0,253	0,569	1,278
13	18,167	3939,3573	112,976	0,540	3,510	3,294
14	19,260	2418,3698	100,197	0,380	2,155	2,922
15	20,273	796,9987	39,208	0,367	0,710	1,143
16	20,820	539,3703	20,681	0,313	0,481	0,603
17	22,153	531,3685	22,849	0,367	0,473	0,666
18	23,193	1111,7175	39,200	0,480	0,991	1,143
19	23,973	171,7854	9,595	0,300	0,153	0,280
20	24,660	2674,3095	136,326	0,340	2,383	3,975
21	25,247	3071,4616	111,357	0,327	2,737	3,247
22	27,267	13009,9738	211,276	0,920	11,592	6,160
23	31,567	20575,0227	103,455	3,400	18,332	3,017
24	36,580	673,2645	19,111	0,573	0,600	0,557
25	37,727	253,7420	7,729	0,540	0,226	0,225
26	47,960	3192,7404	31,462	1,467	2,843	0,920
-	Total	112236,0735	3429,542			

4.7.3 Antioxidační aktivita etherové frakce

4.7.3.1 FRAP metoda

FRAP (ferric reducing antioxidant power) metoda je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda, založená na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Fe^{2+} jsou měřeny spektrofotometricky měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazin (TPTZ), jehož absorpční maximum se nachází při 595nm (Dejian Huang, et al. 2005)



Experiment probíhal podle článku (O. Firuzi, 2005). Jedná se o FRAP metodu modifikovanou za využití mikrodestiček (destičky typu P 400 μl , Fischer). Měření probíhalo na přístroji Microplate reader (Anthos 2010).

Příprava vzorků

Antioxidační aktivita etherové frakce byla porovnávána se standardem troloxu. Nejprve byl připraven roztok troloxu o koncentraci 80 μM .

Trolox (M_w) = 250,3 , nejprve se připraví roztok o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním 1 mg troloxu v 1 ml dimethylsulfoxidu, obsahuje 3995 μM ,

3995 μM X
80 μM 1000 μl

20 μl + 980 μl pufru

Roztok obsahující v 1 ml 80 μM troloxu se připraví z roztoku 1 mg/ml odebráním 20 μl a přidáním 980 μl pufru.

Etherová antioxidační aktivita byla přepočítána na oregonin (diarylheptanoid, vyskytující se v *Alnus glutinosa*).

Nejprve se připravil roztok o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním 1 mg vzorku (etherového odparku) v 1 ml dimethylsulfoxidu, takto vytvořený roztok obsahuje 2089,9 μM (molární koncentrace vzorku přepočtena na oregonin).

2089,9 X

200 μM 1000 μl

96 μl + 904 μl Pufu

Z roztoku o objemu 1 ml a koncentraci 200 μM byly získány naředěním 80 μM , 40 μM , 10 μM roztoky.

Postup

Na mikrodestičku typu P (Brand 400 μl , Fisher) bylo nanášeno do 4 jamek 25 μl Troloxu (konc. 80 μM) a etherový odparek v koncentraci 10-200 μM . Nižší koncentrace 200-10 μM byly připraveny ředěním v acetátovém pufru pH 3,6. Reakční FRAP roztok (175 μl , čerstvě připravený a zahřátý na 37 $^{\circ}\text{C}$) byl přidán k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175 μl acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance 595nm byla měřena na přisroji microplate reader (Anthos 2010) v různých časových intervalech až po dobu 60 min. Změna absorbance $\Delta A_{595\text{nm}}$ byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsí (175 μl FRAP roztoku + 25 μl acetátového pufru) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát při 37 $^{\circ}\text{C}$. FRAP hodnota pro časový interval t (FRAP hodnota t) byl počítán dle vzorce:

$$\text{FRAP hodnota } t \text{ (M)} = (\Delta a_t \text{ FI} / \Delta a_t \text{ Fe}^{2+}) \times 10^{-5}$$

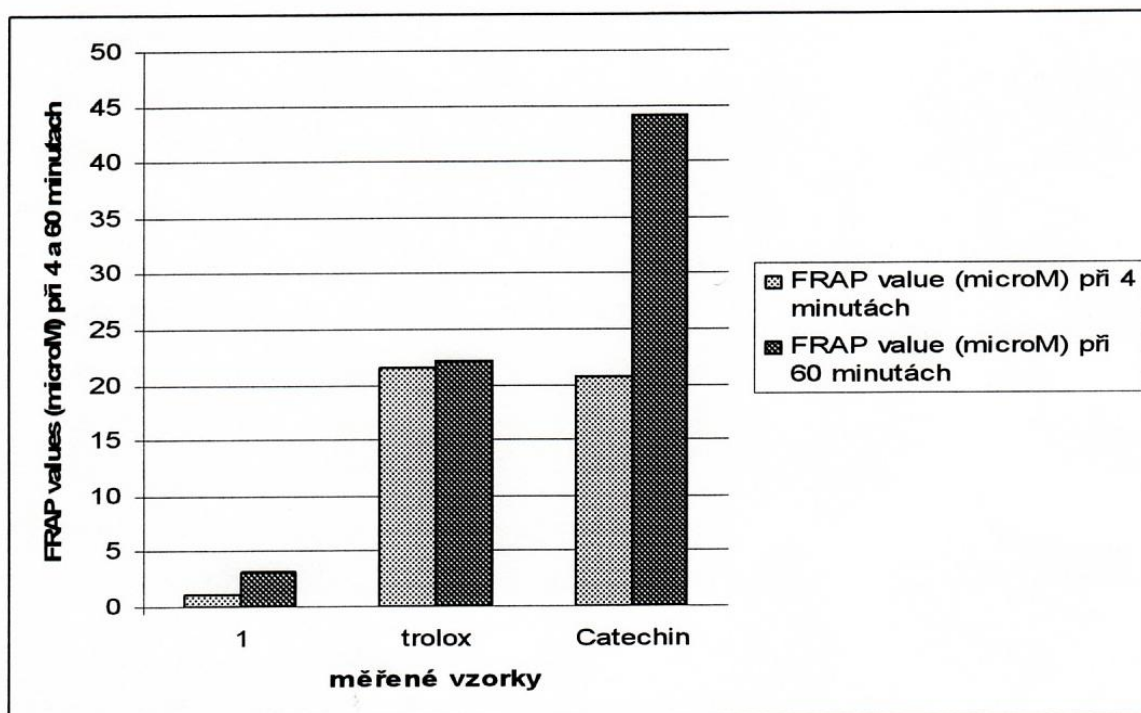
Kde Δa_t Fl je změna v časovém intervalu t (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci 1×10^{-5} M a Δa_t Fe^{2+} je změna absorbance ve stejném časovém intervalu vztažená na železnaté ionty při stejné koncentraci.

Statistická analýza byla vyhodnocena za užití software SigmaPlot 2002 pro Windows version 8.0.

Zhodnocení

Antioxidační aktivita etherového odparku by porovnávana s antioxidačním standardem troloxem, hodnota antioxidační aktivity etherové frakce (1) byla velice nízká ve 4. min (1,17 μM) i v 60. min. (3,2 μM). Naproti tomu trolox projevili svoji antioxidační aktivitu ve 4 min (20,1 μM) i v 60 min (21,5 μM). Etherová frakce vykazuje nízkou antioxidační aktivitu přepočtenou na oregonin. (graf č. 1, tabulka antioxidační aktivity č. 2)

Graf. č. 1



Tabulka antioxidační aktivity č. 2

Vzorek	FRAP hodnota ve 4 min (μ M)	FRAP hodnota ve 60 min (μ M)
1 (etherový odparek)	1,17	3,2
trolox	20,1	21,5

4.7.3.2 Měření antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Antioxidační aktivita etherového výtřepku přepočteného na oregonin byla nízká jak ukázala FRAP metoda, bylo rozhodnuto, že porovnáme antioxidační aktivitu dostupného diarylheptanoidu kurkuminu s etherovou frakcí, jestli náhodou antioxidační aktivita diarylheptanoidů není přeceňována. Pro tento pokus byla zvolena sekvenční injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.

Stanovení antioxidační aktivity probíhalo podle návodu uvedeném v diplomové práci Petra Skály⁽²⁵⁵⁾. Pro přípravu vodných roztoků byla použita vysoce čištěná voda. Připraveny byly tyto roztoky:

- 1) Ethanol 50%, který byl před použitím v SIA systému odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 5 min, roztok sloužil jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud.
- 2) Roztok DPPH v 50% ethanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100 ml odměrné baňce (k úplnému rozpuštění bylo třeba 5 min sonikace) a doplněn vodou na 100 ml. Po dalším 5 min odvzdušnění byla odměrná baňka zatemněna alobalem.
- 3) Etherová frakce byla rozpuštěna v 50% ethanolu, tak, že vznikla koncentrace 1 mg/ml, roztok byl sonikován po dobu 1 min a důkladně protřepán, dále postupným ředěním byly připraveny nižší koncentrace (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml).
- 4) Kurkumim byl rozpuštěn v 50% ethanolu, byl připraven roztok o koncentraci 1 mg/ml a následným ředěním se připravili roztoky o koncentraci 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml.

Tabulka antioxidační aktivity č. 3

Vzorek	EC ₅₀ mg/ml
Etherová frakce	≥ 1
Kurkumin	0,199
Trolox	0,00696

Zhodnocení

Etherová frakce opět vykazovala nízkou antioxidační aktivitu ve srovnání s troloxem. Kurkumin vykazoval sice nižší aktivitu než trolox, ale mnohem vyšší než zkoušená frakce (tabulka antioxidační aktivity č. 3).

5. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Intenzivnímu fytochemickému studiu diarylheptanoidů byly s výjimkou kořenů podrobeny všechny orgány rodu *Alnus*. O problematice obsahových látek diarylheptanoidů v kořenech nebyly dosud publikovány žádné práce. Důvodů bude několik: kořeny nejsou využívány v lidovém léčitelství, nepatří mezi oficiální drogy, relativní obtížnost získávání dostatečného množství (mohu sám potvrdit).

Cílem farmakognostické studie radix *Alnus* spp. se staly kořeny domácího zástupce rodu *Alnus*, olše lepkavé (*Alnus glutinosa*). Materiál použitý v této práci pochází z okolí Bohumína (okrese Karviná), kořeny byly usušeny a rozdrobněny, celkem bylo získáno 5,45 kg drogy. K analýze drogy bylo použito několik typů chromatografie: tenkovrstvá, sloupcová, vysoce účinná kapalinová, plynová v kombinaci s hmotnostním spektrometrem.

Při TLC hodnocení komplexního extraktu, získaného extrakcí drogy roztokem aceton-voda (7:3), se osvědčila soustava hexan-ethylacetát-methanol (2:2:1)-chromatogram č. 1. Z tohoto chromatogramu je zřejmé, že v kořenech se nachází poměrně hodně polárních látek (látky nacházející se do 0,3 retenčního faktoru).

Frakcionace získaného odparku probíhala na testovací silikagelové koloně gradientovým způsobem - se stoupajícím obsahem methanolu v chloroformu (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 100 %), celkem bylo odebráno 36 frakcí, docházelo k dělení. K vyhodnocení frakcí byla použita TLC, detekce ferrichlorid + ferrikyanid (schéma chromatogramů č. 2, 3, 4). Je zajímavé, že u frakcí č. 1-8, 25-27 nedochází k detekci. Látky nereagovaly s detekčním činidlem (ferrichlorid + ferrokyanid).

Po delším časovém období a uskladnění v lednici vypadly jehlicovité bílé krystalky ve frakci č. 7; teplota tání krystalů se pohybovala v rozmezí 175-185 °C (zřejmě důsledek obsahu nečistot), v databázi bylo zjištěno, že v tomto rozmezí se pohybují látky steroidních struktur. Frakce č. 7 byla vyvíjena s dostupnými standardy: cholesterolem a β - sitosterolem (schéma chromatogramu č. 5). Protože výskyt cholesterolu v rostlinách je vácný a retenční faktor se shodoval s β -sitosterolem, lze usoudit na výskyt β - sitosterolu, navíc se objevila ještě jedna skvrna i po čtyřnásobném vyvinutí (chromatogram č. 6). Detekce pomocí GC-MS prozradila výskyt 2 majoritních sterolů: β - sitosterolu a β - sitostanolu, z minoritních pěti sterolů měli největší zastoupení campesterol a campestanol. β - sitosterol byl u dřívějších prací prokázán u druhů olší: *A. formosana* (kmen), *A. nepalensis* (kůra), *A. sieboldiana* (pyl), *A. japonica* (pyl, listy), *A. glutinosa* (plody, pyl, kůra, listy, kořeny), *A. fruticosa* (listy), *A.*

hirsuta (listy), *A. fruticosa* (listy), *A. kamtschatica* (listy), *A. japonica* (listy), *A. manshurica* (listy), *A. rubra* (kůra, kořeny), *A. cordata* (kořeny) ^(23, 26, 29, 31, 34, 36, 37). β -sitostanol byl prokázán u *A. japonica* ⁽³¹⁾. Campesterol byl detekován pouze u *A. japonica* ⁽²⁵⁶⁾. Výskyt campestanolu v rodu *Alnus* nebyl zmiňován v žádných publikovaných pracích.

Ve frakcích č. 10, 19 z testovací silikagelové kolony se objevily drobné žluté krystaly, byly analyzovány pomocí HPLC, frakce č. 19 obsahovala látku s téměř 80 % čistotou (záznam HPLC č. 1). Pro nedostatek látky ve frakci č. 19 byla testována pomocí DPPH radikálu antioxidační aktivita vedlejší frakce č. 18, vedlejší frakce č. 11 byla velkým nedopatřením znehodnocena a nemohla být použita k zjištění antioxidační aktivity. Zjištěná antioxidační hodnota látky č. 19, respektive č. 18 nízká (EC_{50} = 0,32 mg/ml). Pro porovnání několik antioxidačních standardů: kyselina askorbová EC_{50} = 0,006 mg/ml, trolox EC_{50} = 0,014 mg/ml (tabulka antioxidační aktivity č. 1). Z toho vyplývá, že v této frakci se bude těžko nacházet diarylheptanoid (pro diarylheptanoidy je typická antioxidační aktivita).

Poznatky z testovací silikagelové kolony byly použity při dělení na silikagelové koloně s mírnou modifikací- při gradientové eluci byl nahrazen methanol ethanol. Celkem bylo jímáno 42 frakcí. Monitorování probíhalo pomocí TLC (schéma chromatogramů č. 9, 10, 11).

Množství frakce č. 6 bylo dostatečné pro další hodnocení, přečištění, identifikaci. Při TLC monitorování frakce č. 6 byly frakce č. 4, 5 spojeny dohromady (schéma chromatogramů č. 12, 13). Při použití různé detekce při TLC monitorování frakce č. 6, vykazovala tato frakce 1 skvrnu s R_f 0,9. Analýza této frakce na HPLC prokázala hlavní pík s hodnotou R_t 19,33 min, který byl velmi podobný hlavnímu píku kurkuminu (standard diarylheptanoidu dostupný na Katedře farmaceutické otaniky a ekologie) s R_t = 19,41 (záznam HPLC č. 3). Při proměření absorbance hlavního píku frakce č. 6 a kurkuminu byla nalezena určitá podobnost (záznam absorbance č. 1, 2). K získání hlavního píku byla frakce č. 6 frakcionována pomocí HPLC na 6 podfrakcí, hlavní pík s R_t 19,33 min se nachází v podfrakci č. 4 (záznam HPLC č. 4). Z celkové hmotnosti frakce č. 6 (126,7 mg) bylo získáno 80, 3 mg, zřejmě došlo při frakcionaci, nebo při zahušťování jednotlivých frakcí na vakuové odparce ke ztrátám. Do úvahy připadá možnost, že látky v souhrné frakci č. 6 vykazují určitou těkavost. Frakcionaci na jednotlivé podfrakce dokládá i TLC analýza jednotlivých podfrakcí (schéma chromatogramu č. 19). Vyhodnocení hlavní podfrakce č. 4 pomocí HPLC dokládá, že došlo k přečištění, ale jen na 77 % (záznam č. 5), k dalšímu přečišťování nedošlo, protože z původních teoretických možných 55 mg této podfrakce bylo získáno jen 13,7 mg. Tato

podfrakce, přesně polovina, byla zaslána k bližšímu určení na oddělení klinické biochemie FN HK, výsledek ještě není k dispozici.

Z důvodu velkých ztrát při frakcionaci frakce č. 6 z velké kolony a nedosáhnutí důkazu přítomnosti diarylheptanoidu ve zkoušené droze, byla vyzkoušena jednoduchá, rychlá a šetrnou extrakce komplexního extraktu diethyletherem, veškeré zahušťování probíhalo pod dusíkem. Z 30,1 g navážky dogy extrahované jako v předešlých postupech roztokem aceton-voda (7:3) a následném odstranění acetonu probubláváním pod dusíkem a vytřepání vodného roztoku do etheru a zahuštění pod dusíkem, bylo získáno 13,2 mg. Zhodnocení pomocí TLC (schéma chromatogramů č. 21, 22, 23) a HPLC (záznam HPLC č. 6) ukazuje, že v etherové vrstvě se nacházejí látky s podobným R_t a R_f jako u frakce č. 6.

Měření antioxidační aktivity etherové frakce přepočtenou na oregonin a porovnání s antioxidačním standardem troloxem FRAP metodou (tabulka antioxidační aktivity č. 2 a graf č. 1) prokázalo, že antioxidační aktivita etherové frakce je zanedbatelná. Metodou DPPH radikálu byla porovnávána etherová frakce s kurkuminem a troloxem (tabulka antioxidační aktivity č. 3). Výsledná antioxidační aktivita byla opět nízká, naopak u kurkuminu byla potvrzena antioxidační aktivita, byla ale nižší než u troloxu.

Hledané diarylheptanoidy v kořenu *A. glutinosa* se nepodařilo prokázat, ale taky se nepodařilo vyvrátit, že by nebyly přítomny. Diarylheptanoid oregonin byl prokázán dříve v kůře, semenech a listech *A. glutinosa*, proto si myslím, že by se diarylheptanoidy mohly nacházet v kořenech. Nástin v pokračování bádání v této oblasti vidím ve dvou zásadních bodech: 1) mít standard diarylheptanoidu oregoninu, detekce i izolace pak proběhne mnohem rychleji a snáze

2) najít vhodnější způsob izolace, protože izolace podle článku Chen, J. et al. ⁽⁴⁶⁾ se nedařila, muselo se jít vlastní cestou.

6. SOUHRN

Výsledky mé práce lze shrnout takto:

1. Nalezení vlastního způsobu dělení komplexního extraktu pomocí silikagelové kolony gradientovou elucí (vzrůstajícím podílem methanolu/ethanolu v chloroformu)
2. Detekce zástupců sterolů ve frakci č. 7 z testovací silikagelové kolony. Největší zastoupení měl β -sitosterol a β -sitostanol, z minoritních sterolů měli největší zastoupení campesterol a campestanol.
3. HPLC analýza frakce č. 10, 19 z testovací silikagelové kolony. U frakce č. 19 byla měřena antioxidační aktivita metodou DPPH radikálu pomocí sekvenční injekční analýzy (SIA), tato frakce vykazovala slabou antioxidační aktivitu (EC_{50} 0,32 mg/ml)
4. Frakce č. 6, dělená na silikagelové koloně, byla analyzována pomocí HPLC a porovnána s kurkuminem. Byl zjištěn podobný retenční čas (hlavní pík měl R_t 19,33 min, kurkumin měl R_t 19,47 min) a absorpční spektrum jako u kurkuminu. Tato frakce byla frakciována pomocí HPLC na 6 podfrakcí, hlavní pík, se nachází v podfrakci č. 4
5. Získaná přečištěná podfrakce č. 4 frakce č. 6, byla zaslána k bližšímu určení na oddělení klinické biochemie do Fakultní nemocnice Hradec Králové, na výsledek se stále čeká.
6. Získání etherové frakce z komplexního extraktu šetrnou odpařovací metodou-zahušťování roztoku pod dusíkem. Pomocí TLC i HPLC se podařilo prokázat podobný výskyt látek jako u frakce č. 6. Souhrnný etherový odparek byl testován na antioxidační aktivitu metodou FRAP i DPPH radikálu, etherová frakce vykazovala slabou antioxidační aktivitu v porovnání s troloxem i kurkuminem, u kurkuminu potvrzena antioxidační aktivita.
7. Nepodařilo se potvrdit výskyt diarylheptanoidů v kořenu *A. glutinosa*.

7. LITERATURA

-
1. Hejný S., Slavík B.: *Květena České republiky*, 2.díl, Praha: Academia, 1990. 541 s. ISBN 80-200-1089-0
 2. Khvorost O. P. et al.: Chem. Abstr. *111*, 45111 (1989)
 3. Kulagina M. A. et al.: Chem. Abstr. *143*, 272059 (2005)
 4. Yoshida T. et al.: Med. Aromat. Plant. Abstr. *13*, 1283 (1991)
 5. Lee M. W. et al.: Phytochemistry *31*, 2835-2839 (1992)
 6. Ishimatsu M. et al.: Phytochemistry *28*, 3179-3184 (1989)
 7. Cho S. M.: et al.: Med. Aromat. Plant. Abstr. *25*, 2717 (2003)
 8. Lee M. W. et al.: Phytochemistry *31*, 967-970, (1992)
 9. Sanada S. et al.: Chem Abstr. *107*, 151239 (1987)
 10. Matyukhina L. G. et al.: Chem. Abstr. *70*, 84951 (1969)
 11. Ryabinin A. A. et al.: Chem. Abstr. *55*, 119313 (1961)
 12. Ryabinin A. A. et al.: Chem. Abstr. *55*, 76291 (1961)
 13. Domareva T. V. et al.: Chem. Abstr. *56*, 9308 (1962)
 14. Suga T. et al.: Chem. Abstr. *91*, 20798 (1979)
 15. Hirata T. et al.: Chem. Abstr. *86*, 190269 (1977)
 16. Hirata T. et al.: Chem. Abstr. *89*, 110036 (1978)
 17. Hirata T. et al.: Chem. Abstr. *87*, 23547 (1977)
 18. Sakamura F. et al.: Phytochemistry *24*, 2744-2745 (1985)
 19. Hirata T. et al.: Chem. Abstr. *96*, 196513 (1982)
 20. Suga T. et al.: Phytochemistry *25*, 1243-1244 (1986)
 21. Oshitok G. I.: Chem. Abstr. *76*, 32239 (1972)
 22. Suga T. et al.: Phytochemistry *27*, 2915-2920 (1988)

-
23. Chen J. et al.: *Phytochemistry* 53, 971-973 (2000)
 24. Wada H. et al.: *Med. Aromat. Plant. Abstr.* 21, 0619 (1999)
 25. Fischer F. G. et al.: *Chem. Abstr.* 55, 131428 (1961)
 26. Uvarova N. I. et al.: *Phytochemistry* 11, 741-743 (1972)
 27. Sheth K. et al.: *J. Pharm. Sci.* 62, 139-140 (1973)
 28. Chapon M. S. et al.: *Chem. Abstr.* 48, 11144 (1953)
 29. Talapatra S. K. et al.: *Chem. Abstr.* 98, 212890 (1983)
 30. Pasich B. et al.: *Chem. Abstr.* 66, 26574 (1967)
 31. Nomura M. et al.: *Phytochemistry* 20, 1097-1104 (1981)
 32. Pasich B. et al.: *Chem. Abstr.* 66, 26575 (1967)
 33. Lee S. S. et al.: *Nat. Prod. Commun.* 1, 461-464 (2006)
 34. Jain M. C. et al.: *Chem. Abstr.* 76, 1808 (1972)
 35. Matyukhina L. G. et al.: *Chem. Abstr.* 61, 84439 (1964)
 36. Knights B. A. et al.: *Phytochemistry* 20, 2039-2041 (1981)
 37. Chen Ch. K. et al.: *Nat. Prod. Commun.* 1, 299-301 (2006)
 38. Plattner D. D. et al.: *J. Nat. Prod.* 49, 540-545 (1986)
 39. Suga T. et al.: *Phytochemistry* 29, 3611-3614 (1990)
 40. Kumarasamy Y. et al.: *Nat. Prod. Commun.* 1, 641-644 (2006)
 41. Jeong T. S. et al.: *Planta med.* 71, 295-299 (2005)
 42. Kim J. H. et al.: *FEBS Lett.* 580, 385-392 (2006)
 43. Barchesy J. J. et al.: *J. C. S. Chem. Comm.* 16, 649-650 (1974)
 44. Cho S. M. et al.: *Arch. Pharm. Res.* 25, 885-888 (2002)
 45. González L. F. et al.: *J. Nat. Prod.* 61, 1292-1294 (1998)
 46. Chen, J. et al.: *Planta med.* 64, 74-75 (1998)
 47. Nomura M. et al.: *Chem. Abstr.* 83, 96622 (1975)

-
48. Dictionary of natural products on CD-ROM [databáze na CD-ROM]
 49. Hashimoto T. et al.: *Med. Aromat. Plant. Abstr.* 9, 1800 (1987)
 50. Terazawa M. et al.: *Chem. Abstr.* 101, 132742 (1984)
 51. Bae C. et al.: *Med. Aromat. Plant. Abstr.* 20, 0322 (1998)
 52. Takashi S. et al.: *Chem. Abstr.* 103, 157293 (1985)
 53. Kuroyanagi M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 53, 1519-1523 (2005)
 54. Kim H. J. et al.: *Chem. Abstr.* 144, 386477 (2005)
 55. Kim J. H. et al.: *Arch. Pharm. Res.* 28, 177-179 (2005)
 56. Gonzalez L. R. F.: *Chem Abstr.* 131, 85522 (1999)
 57. Lee Y. A. et al.: *Chem Abstr.* 133, 159910 (2000)
 58. Kang H. M. et al.: *Chem. Abstr.* 144, 100737 (2005)
 59. Grechin P. V. et al.: *Chem. Abstr.* 140, 14858 (2004)
 60. Suga T. et al.: *Chem. Abstr.* 77, 98718 (1972)
 61. Asakawa Y. et al.: *Chem Abstr.* 73, 106270 (1970)
 62. Neuder B. et al.: *Phytochemistry* 27, 3839-3843 (1988)
 63. Simoneit B. R. T. et al.: *Atmos. Environ.* 33, 173-182 (1999)
 64. Mendez J. et al.: *Chem. Abstr.* 69, 8884 (1968)
 65. Wollenweber E. et al.: *Phytochemistry* 13, 2318-2319 (1974)
 66. Wagner H.: *Tetrahedron* 33, 1411-1414 (1977)
 67. Hanawa F.: *Bull. FEPRI* 2, 85-91 (2003)
 68. Lee M. W. et al.: *Chem. Abstr.* 132, 21066 (1999)
 69. Ahn K. W. et al.: *Chem. Abstr.* 133, 196043 (2000)
 70. Corse, J. et al.: *Chem. Abstr.* 100, 34316 (1983)
 71. Tori M. et al.: *Phytochemistry* 40, 1263-1264 (1995)
 72. Favre B. J. et al.: *Phytochemistry* 17, 821-822 (1978)

-
73. Wheeler C. T. et al.: *Phytochemistry* 9, 705-708 (1970)
74. Tomoskozi F. et al.: *Chem Abstr.* 132, 34784 (1999)
75. Ohmoto T. et al.: *Chem. Abstr.* 86, 136367 (1977)
76. Kimura Y. et al.: *Chem. Abstr.* 99, 205610 (1983)
77. Hideyuki I. et al.: *Cancer Lett.* 143, 5-13 (1999)
78. Kolodziej, H. et al.: *Planta med.* 67, 825-832 (2001)
79. Zong Ch. Y. et al.: *Cancer Lett.* 242, 77-87 (2006)
80. Miyamoto K. et al.: *Anticancer Res.* 13, 37-42 (1993)
81. Funatogawa K. et al.: *Chem. Abstr.* 141, 391771 (2004)
82. Shiota S. et al.: *Chem. Abstr.* 140, 388521 (2004)
83. Zongchun Y. et al.: *Chem. Abstr.* 140, 297421 (2004)
84. Kim H. J. et al.: *Chem. Abstr.* 135, 74004 (2001)
85. Satomi H. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 16, 787-790 (1993)
86. Kitakana S. et al.: *Chem. Abstr.* 133, 144659 (2000)
87. Ishii R. et al.: *Chem. Abstr.* 131, 193938 (1999)
88. Su J. D. et al.: *Chem. Abstr.* 109, 89705 (1988)
89. Chen Ch. et al.: *Planta med.* 70, 1022-1026 (2004)
90. Kou P. L. et al.: *Planta med.* 71, 237-243 (2005)
91. Kuo P. L. et al.: *Anticancer. Drug.* 16, 409-415 (2005)
92. Yang L. L. et al.: *Cancer Lett.* 157, 65-75 (2000)
93. Cheby H. Y. et al.: *Antiviral Res.* 55, 447-455 (2002)
94. Kashiwada Y. et al.: *J. Nat. Prod.* 55, 1033-1043 (1992)
95. Dong H. et al.: *Chem. Abstr.* 130, 20410 (1998)
96. Yi W. X. et al.: *J. Etnopharmacol.* 109, 128-133 (2007)
97. Lee D. I. et al.: *Chem. Abstr.* 133, 144656 (2000)

-
98. Lee D. I. Et al.: Chem. Abstr. *133*, 129613 (2000)
99. Chang J. H. et al.: Chem. Abstr. *124*, 135034 (1996)
100. Joo S. S. et al.: Chem. Abstr. *140*, 350216 (2003)
101. Lee D. I. et al.: Chem. Abstr. *129*, 254538 (1998)
102. Joo S. S. et al.: Chem. Abstr. *139*, 486 (2003)
103. Jeon H. J. et al.: Chem. Abstr. *138*, 391048 (2002)
104. Bo Z. et al.: Chem. Phys. Lipids *131*, 15-25 (2004)
105. Hirofumi T. et al.: Bioch. Biophys. Res. Commun. *280*, 53-60, 2001
106. Mingshi H. A. W. et al.: Chem. Abstr. *130*, 194358 (1999)
107. Nishimura K. et al.: Chem. Abstr. *134*, 338258 (2001)
108. Ziegler H. L. et al.: Chem. Abstr. *145*, 284157 (2006)
109. Varatharajan S. et al.: Vascul. Pharmacol. *46*, 412-418 (2007)
110. Hasenah A. et al.: J. Ethnopharmacol. *107*, 449-455 (2006)
111. Preetha S. P. et al.: Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. & Pharmacol. *143*, 333-339 (2006)
112. Ajayeoba E. O. et al.: Fitoterapia *74*, 706-709 (2003)
113. Fournet H. et al.: J. Ethnopharmacol. *37*, 159-164 (1992)
114. Deschamps J. D. et al.: Planta med. *70*, 263-265 (2004)
115. Akihisa T. et al.: Chem. Abstr. *135*, 338752 (2001)
116. Madureira A. M. et al.: Nat. Prod. Res. *17*, 375-380 (2003)
117. Alakurtti S. et al.: Chem. Abstr. *145*, 305406 (2006)
118. Szuster C. A. et al.: Chem. Abstr. *144*, 343510 (2006)
119. Lee J. H. et al.: Arch. Pharm Res. *27*, 53-56 (2004)
120. Naik D. G. et al.: Planta med. *70*, 68-69 (2004)
121. Lall N. et al.: S. Afr. J. Bot. *72*, 579-583 (2006)

-
122. Osawa K. et al.: Chem. Abstr. *128*, 70376 (1997)
123. Chandler R. F. et al.: Chem. Abstr. *90*, 133128 (1979)
124. Zhao J. et al.: Tromb. Res. *57*, 957-966 (1990)
125. Yoshiyuki M. et al.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *99*, 100-107 (2006)
126. Bouic P. J. D. et al.: Int. J. Immunopharmacol. *18*, 693-700 (1996)
127. Plat J. et al.: Chem. Abstr. *144*, 482891 (2005)
128. Bykhovets A. I. et al.: Chem. Abstr. *119*, 197743 (1993)
129. Alexander L. R. L. et al.: Phytother. Res. *18*, 403-407 (2004)
130. Kolak U. et al.: Planta med. *67*, 761-763 (2001)
131. Hirano T. et al.: Planta med. *60*, 30-33 (1994)
132. Sunq J. H. et al.: Arch. Pharm. Res. *22*, 633-637 (1999)
133. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B7GVW-4N516YD-1-7&_cdi=20441&_user=4170871&_orig=search&_coverDate=02%2F27%2F2007&_sk=9999999999&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWA&md5=68a6c9db6d35b88df2c384f3b39ea87a&ie=/sdarticle.pdf [cit. 2007-06-03]
134. Chung M. Y. et al.: Chem. Abstr. *144*, 404136 (2006)
135. Rzeski W. et al.: Chem. Abstr. *146*, 38642 (2006)
136. Andrej B.: Plant. Physiol. Biochem. *38*, 209-215, (2000)
137. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=14111547&query_hl=79&itool=pubmed_docsum [cit. 2007-04-03]
138. Kim H. J. et al.: Chem. Abstr. *143*, 71275 (2005)
139. Cho S. M. et al.: Arch. Pharm. Res. *25*, 885-888 (2002)
140. Lee M. W. et al.: Biol. Pharm. Bull. *23*, 517-518 (2000)
141. Joo S. S. et al.: Chem. Abstr. *138*, 248059 (2002)
142. Kuroyanagi M. et al.: Chem. Pharm. Bull. *53*, 1519-1523 (2005)

-
143. Lee S. L. et al.: *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 6175-6181 (2005)
- 144 Lee C. J. et al.: *Br. J. Pharmacol.* *146*, 378-388 (2005)
145. Takashi M. et al.: *Chem. Abstr.* *142*, 35057 (2004)
146. Matsuda H. et al.: *Chem. Abstr.* *130*, 119389 (1998)
147. Yue J. et al.: *Chem. Abstr.* *145*, 159771 (2006)
148. Juany W. et al.: *Chem. Abstr.* *146*, 389062 (2007)
149. Wang Z. et al.: *Chem. Abstr.* *145*, 342237 (2006)
150. Yang Y. et al.: *Chem. Abstr.* *130*, 246745 (1999)
151. Hisashi M. et al.: *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 138-142 (2006)
152. Yang Y. et al.: *Phytomedicine* *9*, 146-152 (2002)
153. Kim Y.: *Chem. Abstr.* *138*, 398693 (2003)
154. Liu Z. et al.: *Chem. Abstr.* *139*, 163893 (2003)
155. Martin T. S. et al.: *Chem. Abstr.* *133*, 176459 (2000)
156. Han H. K. et al.: *Chem. Abstr.* *146*, 244219 (2006)
157. Yokosuka A. et al.: *Chem. Abstr.* *136*, 291730 (2002)
158. Lee J. H. et al.: *Chem. Abstr.* *140*, 246902 (2003)
159. Lee M. W. et al.: *Planta med.* *66*, 551-553 (2000)
160. Jin Ch. Ch. et al.: *Food Chem.* *104*, 132-139 (2007)
161. Midorikawa S. et al.: *Chem. Abstr.* *143*, 152386 (2005)
162. Li X. W. et al.: *Chem. Abstr.* *146*, 19809 (2006)
163. Zhang T. et al.: *Chem. Abstr.* *142*, 190336 (2004)
164. Kurup A. et al.: *Chem. Abstr.* *111*, 923 (1989)
165. Shimizu K. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* *424*, 181-188 (2004)
166. Ohnishi H. et al.: *Biofactors.* *21*, 315-319 (2004)
167. Wu P. L. et al.: *Chem. Abstr.* *141*, 103172 (2004)

-
168. Lejny K. et al.: Chem. Abstr. *146*, 198128 (2007)
169. Kayser O. et al.: Chem. Abstr. *131*, 2695 (1999)
170. Galabov A. S. et al.: Chem. Abstr. *125*, 265032 (1996)
171. Elliott S. et al.: Ann. Rheum. Dis.: *60*, 158-165 (2001)
172. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6R-4N5CXN6-2&_user=4170871&_coverDate=03%2F01%2F2007&_alid=563509300&_rdoc=2&_fmt=su_mmary&_orig=search&_cdi=5037&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=137&_acct=C000053052&_version=1&_urlVersion=0&_userid=4170871&md5=cb3f6b32f26a7dde336821683a5543bb [cit. 2007-05-04]
173. Chau J. W. et al.: Cancer Lett. *183*, 163-168 (2002)
174. Gilani A. H. et al.: Pharmacol. Res. *37*, 31-35 (1998)
175. Sook Y. Ch. H. et al.: Chem. Abstr. *108*, 68326 (1988)
176. Tanaka T. et al.: Cancer Res. *53*, 3908-3913 (1993)
177. Toshibo K. et al.: Chem. Abstr. *145*, 504504 (2006)
178. Szwajgier D.: Chem. Abstr. *145*, 204862 (2006)
179. Luc M. M. et al.: Phytochemistry *68*, 591-595 (2007)
180. Kroes B. H. et al.: Chem. Abstr. *119*, 479 (1993)
181. Gomes C. A. et al.: J. Med. Chem. *46*, 5395-5401 (2003)
182. Aaby K. et al.: J. Agric Food Chem. *53*, 4032-4040 (2005)
183. Papoutzi Z. et al.: J. Agric Food Chem. *53*, 7715-7720 (2005)
184. Sroka Z. et al.: Chem. Abstr. *139*, 239641 (2003)
185. Yeh C. T. et al.: J. Agric Food Chem. *51*, 1474-1479 (2003)
186. Rashid R. B. et al.: Chem. Abstr. *139*, 227269 (2003)
187. Murillo J. I. et al.: Fitoterapia *74*, 226-230 (2003)
188. Afifi F. U. et al.: Chem. Abstr. *115*, 252095 (1991)

-
189. Burow M. E. et al.: *Nutr. Cancer.* 38, 229-244 (2000)
190. Huanq M. T. et al.: *Carcinogenesis.* 4, 1631-1637 (1983)
191. Martini N. D. et al.: *Chem. Abstr.* 141, 239681 (2004)
192. Shimada H.: *Chem. Abstr.* 145, 159042 (2006)
193. Zang B. et al.: *Chem. Abstr.* 144, 480685 (2005)
194. Amarowicz R. et al.: *Chem. Abstr.* 145, 165892 (2005)
195. Limtrakul P. et al.: *J. Chemother.* 17, 86-95 (2005)
196. Wang C. N. et al.: *J. Biol. Chem.* 276, 5287-5295 (2001)
197. Rogers J. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 419-425 (1989)
198. Oh S. M. et al.: *Chem. Abstr.* 140, 297714 (2004)
199. Tasdemir D. et al.: *Chem. Abstr.* 145, 55366 (2006)
200. Erazo S. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 57, 81-83 (1997)
201. Hodnick W. F. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 47, 573-580 (1994)
202. Bao M. et al.: *Chem. Abstr.* 145, 389039 (2006)
203. Albulesco M. et al.: *Chem. Abstr.* 146, 235615 (2007)
204. Malaveille Ch. et al.: *Chem. Abstr.* 129, 199208 (1998)
205. Zhao J. et al.: *Tromb. Res.* 57, 957-966 (1990)
206. Calderone V. et al.: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370, 290-298 (2004)
207. Walle T. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 73, 1288-1296 (2007)
208. Zhanq T. et al.: *Bioorg. Med. Chem.:* 12, 6097-7005 (2004)
209. Cardenas M. et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 2966-2971 (2006)
210. Babu K. S. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 221-224 (2006)
211. Butela S. T. et al.: *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 12, 39-46 (1996)
212. Pozza A. et al.: *Cancer Res.* 65, 4852-4860 (2005)
213. Lee S. et al.: *Arch. Pharm. Res.* 26, 43-46 (2003)

-
214. Kuo Y. C et al.: *Planta med.* 70, 1237-1239 (2004)
215. Banskota A. H. et al.: *Chem. Abstr.* 129, 144582 (1998)
216. Rubio S. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 548, 9-20 (2006)
217. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17408892&query_hl=7&itool=pubmed_docsum [cit. 2007-08-04]
218. Trifunovic S. et al.: *Phytochemistry* 67, 887-893 (2006)
219. Muschietti L. et al.: *Planta med.* 67, 743-744 (2001)
220. Perez R. M. et al.: *Phytomedicine* 7, 25-29 (2000)
221. Khan T. et al.: *Chem. Abstr.* 139, 270312 (2003)
222. Michel F. et al.: *Chem. Abstr.* 105, 145681 (1986)
223. Awale S. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2231-2234 (2005)
224. Pan M. H. et al.: *J. Agric Food Chem.* 53, 620-630 (2005)
225. Liu Z. Q. et al.: *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1557-1562 (2004)
226. Kraft C. et al.: *Phytother. Res.* 17, 123-128 (2003)
227. Toison O. et al.: *Phytochemistry* 65, 2173-2176 (2004)
228. Kupchan S. M. et al.: *Tetrahedron* 25, 1603-1615 (1969)
229. Sönmez B. U. D. et al.: *Vascul. Pharmacol.* 43, 220-226 (2005)
230. Jones W. P. et al. *J. Nat. Prod.* 70, 372-377 (2007)
231. Zahir A. et al.: *J. Nat. Prod.* 59, 701-703 (1996)
232. Fraga C. G. Et al.: *Biochem. Pharmacol.* 36, 717-720 (1987)
233. Kiminori M. et al.: *Life Sci.* 80, 1578-1585 (2007)
234. She Ch. W. et al.: *LWT-Food Sci. Technol.* 40, 506-512 (2007)
235. Arlorio M. et al.: *Food Res. Int.* 38, 1009-1014 (2005)
236. Conte A. et al.: *Brain Res. Bull.* 62, 29-38 (2003)
237. Yamazaki E. et al.: *Food Chem.* 100, 171-177 (2007)

-
238. Trumbeckaite S. et al.: Biomed. Pharmacother. 60, 245-248 (2006)
239. Manga H. M. et al.: J. Ethnopharmacol. 92, 209-214 (2004)
240. Yadav S. B. et al.: Chem. Abstr. 136, 194189 (2001)
241. Liu R. et al.: Chem. Abstr. 145, 321001 (2006)
242. Lana E. J. L. et al.: Chem. Abstr. 144, 386200 (2006)
243. Yang Y. et al.: Chem. Abstr. 146, 155859 (2007)
244. Vargas F. et al.: Chem. Abstr. 142, 233177 (2004)
245. Yang Y. et al.: Chem. Abstr. 139, 392508 (2003)
246. Liu M. et al.: Chem. Abstr. 125, 322763 (1996)
247. Cohen P. A. et al.: Chem. Abstr. 124, 284089 (1996)
248. Mijatovic S. et al.: Cell Mol Life Sci. 61, 1805-1815 (2004)
249. Mitchell P. L. et al.: Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids 1734, 269-276 (2005)
250. Müller A. et al.: Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids 1737, 145-151 (2005)
251. Erazo S. et al.: J. Ethnopharmacol. 107, 395-400 (2006)
252. Lakshmi V. et al.: Nat. Prod. Res. 20, 1295-1299 (2006)
253. Garcia Q. H. G. et al.: Chem. Abstr. 104, 165189 (1986)
254. Desmarchelier C. et al.: Chem. Abstr. 145, 96338 (2006)
255. Skála P.: *Diplomová práce*. Karlova univerzita, Hradec Králové 2003.
256. Tsutsuki K. et al.: Chem. Abstr. 126, 274801 (1997)